

DIE PRIMÄRSTRUKTUR DES KALLIKREINS AUS
SCHWEINEPANKREAS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-
Universität München

vorgelegt von
Werner Ehret
München
März 1976

DIE PRIMÄRSTRUKTUR DES KALLIKREINS AUS
SCHWEINEPANKREAS



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-
Universität München

vorgelegt von

Werner Ehret

München

März 1976



1. Berichterstatter: Prof. H. Fritz
2. Berichterstatter: Prof. F. Lynen

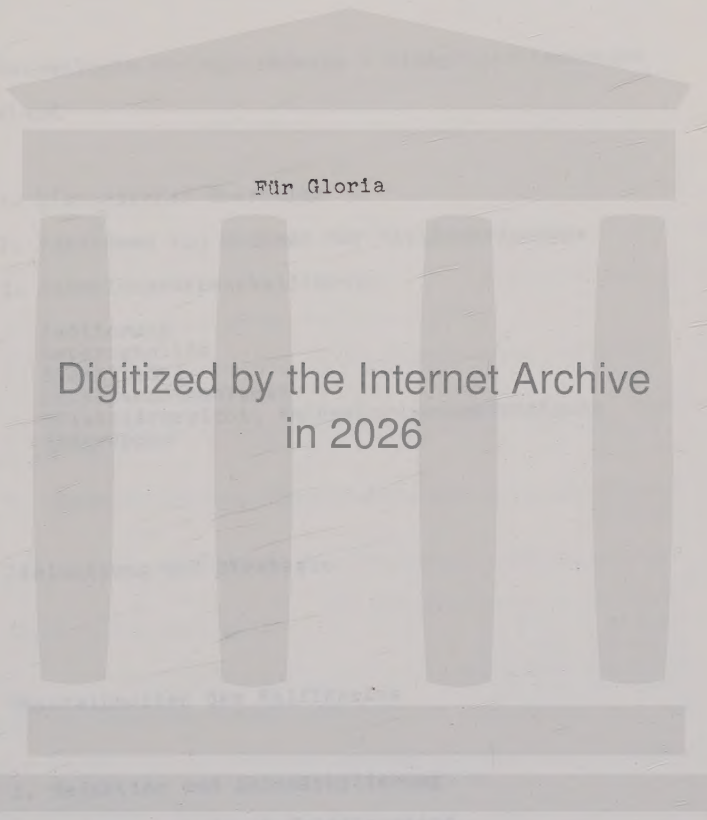
Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 1976

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für
Klinische Chemie und Klinische Biochemie der
Universität München durchgeführt

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle (gestorben im Mai
1975) und Herrn Prof. Dr. H. Fritz danke ich
für die großzügige Förderung meiner Arbeit

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. F.
Fiedler für zahlreiche Diskussionen und wert-
volle Anregungen

Weiter gilt mein Dank für wertvolle experimentelle
Hilfe Frä. C. Hirschauer, Frä. G. Leysath und Frä.
G. Puff sowie Frä. G. Lass und Frau M. Meier für
ihre Unterstützung bei den schriftlichen Arbeiten



Für Gloria

Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Enzymologie der Kallikreine - bisheriger Kenntnis-	1
stand	
1. Historischer Überblick	1
2. Vorkommen von Enzymen der Kallikreingruppe	2
3. Schweinepankreas-kallikrein	3
Isolierung	3
Heterogenität	3
Spezifität	4
Katalysemechanismus	7
Molekulargewicht, Aminosäurezusammensetzung	8
Endgruppen	9
II. Zielsetzung und Strategie	12
III. Untereinheiten des Kallikreins	16
1. Reduktion und Aminoäthylierung	16
Auftrennung durch Gelfiltration	16
SDS-Elektrophorese	16
Aminosäureanalyse von Einzelfractionen	19
Endgruppenbestimmung	21

	Seite
2. Reduktion und Carboxymethylierung	23
Auftrennung durch Gelfiltration	23
Elektrophoresen	25
3. Weitere Trennsysteme	28
Gelfiltration	28
Ionenaustauschchromatographie	31
4. Aminosäurezusammensetzung der Ketten	32
A-Kette	32
B-Kette	35
5. Nebenkomponenten der Kettentrennung	39
6. Zusammenfassung	48
 IV. A-Kette	 53
1. Trypsinspaltung aminoäthylierter und maleylierter A-Kette	53
2. Trypsinspaltung carboxymethylierter A-Kette	58
Fraktionen A-T-I und A-T-Ia	60
Peptid A-T-II	60
Fraktion A-T-III	64
Fraktion A-T-IIIa	69
Fraktion A-T-IV-1	76
Peptid A-T-IV-2	80
3. Sequenz der A-Kette (Schema 1)	80

	Seite
V. B-Kette	89
1. Trypsinspaltung aminoäthylierter und maleylierter B-Kette	89
2. Bromcyanspaltung aminoäthylierter B-Kette	93
3. Bromcyanspaltung carboxymethylierter B-Kette	96
Peptid B-CB-I	102
Peptidchromatographie an SP-Sephadex mit einem Salzgradienten in schwach gepufferter 50 %iger Essigsäure	108
Peptid B-CB-II	110
Fraktion B-CB-IV	115
Peptid B-CB-III	125
4. Trypsinspaltung des Peptids B-CB-II	129
5. Trypsinspaltung des carboxymethylierten Peptids B-CB-I	133
6. Trypsinspaltung des aminoäthylierten Peptids B-CB-I	142
7. Sequenz der B-Kette (Schema 2)	154
VI. Experimenteller Teil	169
1. Modifikationsreaktionen	169
Reduktion und Aminoäthylierung	169
Reduktion und Carboxymethylierung	169
Maleylierung	170
2. Chromatographische Trennungen	170
Ninhydrinreaktion	171

	Seite
3. Elektrophoretische Methoden	172
SDS-Elektrophorese	172
Disk-Elektrophorese	173
Dünnschichtelektrophorese	173
4. Endgruppenanalysen	174
Bestimmung der Aminoendgruppe nach der Dansylmethode	174
Bestimmung der Aminoendgruppe nach der Cyanatmethode	175
Bestimmung der C-terminalen Endgruppe durch Hydrazinolyse	176
5. Aminosäureanalysen	176
6. Spektrophotometrische Bestimmung des Tryptophangehaltes	179
7. Bestimmung des Proteingehaltes	179
8. Methoden zur Spaltung von Peptidbindungen	180
Bromcyanspaltungen	180
Trypsinspaltungen	180
VII. Diskussion	183
1. Zur Methode der Aufklärung der Aminosäuresequenz	183
2. Über die Homologie des Kallikreins mit anderen Serinproteasen	187
Allgemeine Bemerkungen	187
Zuordnung der Sequenz des Kallikreins (Schema 3)	194
Aufbau des Kallikreinmoleküls aus Ketten	219
Verwandtschaftsbeziehungen	224

	Seite
3. Über die Beziehung zwischen Struktur und Reaktivität	227
Aktivierung	228
Aktives Zentrum	230
Primärspezifität	232
Sekundärspezifität	233
Wechselwirkung mit Inhibitoren	234
 VIII. Zusammenfassung	 245
 Literaturverzeichnis	 249
 Verzeichnis der Abkürzungen	 261
 Lebenslauf	 263

I. Enzymologie der Kallikreine - bisheriger Kenntnisstand

1. Historischer Überblick

Bei der näheren Untersuchung einer Substanz mit stark hypotoner Wirkung auf den Hundeblutdruck, die ursprünglich im Urin entdeckt worden war, fanden Kraut, Frey und Werle in den dreißiger Jahren größere Mengen davon in Bauchspeicheldrüsen. Das Pankreas wurde deshalb zunächst als der Herkunftsort dieser Substanz angesehen. Sie erhielt nach dem Wort "kallikreas", einer zweiten griechischen Bezeichnung für Pankreas, den Namen Kallikrein (1).

Nachdem bereits seit längerem vermutet worden war, daß es sich bei dem untersuchten Stoff um ein Enzym handeln müsse, fand Werle im Jahre 1936 das entsprechende Substrat. Während Kallikrein selbst am isolierten Meerschweinchendarm wirkungslos ist, konnte er zeigen, daß durch Einwirkung des Enzyms auf Serum eine Substanz entsteht, die den präparierten Meerschweinchendarm zu starker Kontraktion veranlaßt (2,3). Dieses Produkt erhielt den Namen Kallidin.

Eine ähnliche Substanz, das Bradykinin, fand Rocha e Silva 1949 durch die Einwirkung von Trypsin oder Schlangengifthydrolasen

auf Serum (4). Bradykinin und Kallidin werden beide aus Kininogen, einem sauren α -2-Glykoprotein, freigesetzt (1). Beide Produkte weisen eine enge strukturelle Beziehung auf. Beim Bradykinin handelt es sich um ein Nonapeptid bekannter Sequenz, Kallidin ist ein Dekapeptid gleicher Sequenz mit einem zusätzlichen Lysinrest am Aminoterminus (5,6,7).

2. Vorkommen von Enzymen der Kallikreingruppe

Soweit bislang untersucht, sind Kallikreine (EC 3.4.21.9) in Blut und Organen von Säugetieren weit verbreitete Enzyme (1). Neben dem bereits erwähnten Vorkommen im Pankreas wurden in Mundspeicheldrüsen, vor allem in gl. submandibularis, verschiedener Spezies Kallikreine in relativ hoher Konzentration aufgefunden (8). Im Harn wird Kallikrein ausgeschieden, das im wesentlichen in der Niere selbst gebildet zu werden scheint (1). In den Schleimhäuten des Verdauungstraktes findet sich ebenfalls Kallikrein, vor allem wohl in der Zymogenform (9).

Das Kallikrein des Blutes unterscheidet sich stark von allen anderen bislang aufgefundenen Kallikreinen. Sein Molekulargewicht ist mit fast 100 000 etwa dreimal so hoch (10,11), aus Kininogen setzt es anstelle von Kallidin Bradykinin frei und im Gegensatz zu Drüsenkallikreinen wird es vom Inhibitor aus Sojabohnen sowie von Ovomuroid gehemmt (1).

3. Schweinepankreas kallikrein

Isolierung

Kallikrein aus Schweinepankreas ist das am besten untersuchte Enzym der Kallikreingruppe. Im folgenden wird unter Kallikrein stets dieses Enzym verstanden.

Es sind verschiedene Verfahren zur Isolierung von Kallikrein beschrieben worden (12-15), jedoch erweist sich die Gewinnung einer größeren Menge an reinem Enzym als recht aufwendig, da nach Kutzbach und Schmidt-Kastner für die Herstellung eines Gramms Kallikrein die Aufarbeitung von ca. 100 kg Pankreas erforderlich ist (16). Das Enzym liegt in diesem Organ mit ca. 60 mg pro kg Frischgewicht in etwa hundertfach niedrigerer Konzentration als Trypsin oder Chymotrypsin vor (15). Allen bisher beschriebenen Isolierungsverfahren gemeinsam ist die einleitende Autolyse des Pankreas, wobei aus Präkallikrein aktives Kallikrein freigesetzt wird.

Heterogenität

Habermann berichtete über die elektrophoretische Auftrennung des Kallikreins bei pH 8-9 in zwei aktive Fraktionen, die er als A und B bezeichnete (12). Die Chromatographie des Kallikreins an DEAE-Cellulose nach Schmidt-Kastner lieferte ebenfalls zwei ak-

tive Kallikreinfraktionen, die den Zonen Habermanns in ihrer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit entsprachen (15).

Bei pH 8,6 elektrophoretisch homogenes Kallikrein A oder B zeigte bei der Elektrophorese bei pH 4 und bei der isoelektrischen Fokussierung eine Auftrennung in ca. fünf weitere Banden (13,17). Die Abspaltung der Sialinsäurereste durch Behandlung mit Neuraminidase nach Fritz et al. (13) lieferte elektrophoretisch weitgehend homogenes Kallikrein mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 4,05 (17).

Weder die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung und der N- und C-terminalen Endgruppen (18) noch Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften (19) haben zwischen den Kallikreinen A und B einen Unterschied erkennen lassen. Kallikrein B unterscheidet sich von Kallikrein A nur durch einen etwa doppelt so hohen Kohlenhydratgehalt (18) (Tab.1). Ob die Kallikreine A und B, wie es die Isolierung zweier verschiedener Präkallikreine durch Fiedler et al. vermuten läßt (17), zwei distinkte Biosyntheseprodukte des Pankreas oder Artefakte der Isolierung sind, läßt sich bislang nicht eindeutig festlegen.

Spezifität

Untersuchungen der Spaltung von α -N-acylierten Aminosäureestern durch Kallikrein zeigten eine ausgeprägte Bevorzugung N-substituierter L-Argininester als Substrate. So wird α -N-Benzoyl-L-

argininmethylester um den Faktor 159 (k_{cat}/K_m) schneller hydrolysiert als der entsprechende Lysinester (20). Die Spezifitätskonstanten des Trypsins für Argininderivate dürften etwa um den Faktor 5-10 höher liegen als für die analogen Lysinderivate (21). Wie Trypsin hydrolysiert auch Kallikrein die Ester neutraler Aminosäuren, jedoch wie dieses mit sehr viel geringerer Geschwindigkeit (20).

Obwohl die katalytischen Eigenschaften des Kallikreins denen des Trypsins somit in mancher Hinsicht ähneln, zeigt Kallikrein im Gegensatz zu Trypsin keine allgemeine proteolytische Aktivität.

Tab.1 Durchschnittlicher Kohlehydratgehalt von neuraminidase-behandelten Kallikreinen A und B (18) (Reste pro Molekül)

	Kallikrein A	Kallikrein B
Mannose	3,3	5,7
Galactose	0,8	1,5
Fucose	0,5	1,1
Glucosamin	3,9	9,5
Gesamtkohlehydrate (Gewichts %)	5,6	11,5

So liegt die proteolytische Wirkung reiner Kallikreinpräparate gegenüber Casein nur noch im Bereich eines Hundertstels derjenigen von Trypsin (22).

Wie quantitative Untersuchungen der Hydrolyse mehrerer argininhaltiger Peptide durch Kallikrein ergaben (23), ist dieses Enzym jedoch durchaus in der Lage, gewisse Peptidbindungen mit erheblicher Effektivität zu spalten (Tab.2). Beide Peptide, die von Kallikrein schnell hydrolysiert wurden, umfassen einen Teil der C-terminalen Kininsequenz und zusätzlich drei weitere Reste, wie sie Habermann in einem aus Kininogen isolierten Peptid fand (24). Wie bereits die Untersuchungen an Estersubstraten hatten erwarten lassen, betraf die Hydrolyse stets die Arg-Ser Bindung. Während jedoch Trypsin zwischen Pro-Phe-Arg-Ser-Val-Gln und Ac-Gly-Arg-Ser-Val-Gln kaum unterscheidet, spaltet Kallikrein das erste Substrat mit etwa 1000-fach höherer Geschwindigkeit. Wie weitere Untersuchungen unseres Arbeitskreises durch den Vergleich der Hydrolyseraten von Ac-Gly-Arg-Ser-Val-Gln mit Ac-Phe-Arg-Ser-Val-Gln erbrachten, kommt dem N-terminal von Arginin stehenden Phenylalaninrest bei der Erkennung eines guten Substrates durch Kallikrein entscheidende Bedeutung zu. Eine N-terminale Verlängerung um einige weitere Reste der Kininsequenz (Peptid 3 der Tab.2) übt keinen zusätzlichen Einfluß mehr aus. So erscheint Kallikrein als ein Enzym, das insbesondere der Hydrolyse von Kininogen gut angepaßt ist.

Tab.2 Vergleich der Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung verschiedener Substrate durch Kallikrein und β -Trypsin (23)

(Substratkonzentration 0,25 mM; 0,1 M NaCl; 0,1 mM Thio-
glykolsäure; pH 9,0; 25° C; mit Trypsin 0,025 M CaCl_2)

Substrate	Kallikrein $\mu\text{mol/min/mg}$	Trypsin $\mu\text{mol/min/mg}$
1. Bz-Arg-OEt	260	70
2. Ac-Gly-Arg-Ser-Val-Gln	0,01	130
3. Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Ser- Val-Gln	8	nicht best.
4. Pro-Phe-Arg-Ser-Val-Gln	12	110

Katalysemechanismus

Die Ergebnisse mehrerer Arbeiten lassen darauf schließen, daß Kallikrein zur Gruppe der Serinhydrolasen vom Typ des Trypsins oder Chymotrypsins gehört.

So hatten Untersuchungen von Habermann (25) die Hemmbarkeit von Kallikrein durch DFP gezeigt. In unserem Arbeitskreis konnte nachgewiesen werden, daß DFP im Verhältnis 1:1 in Kallikrein eingebaut und an einen Serinrest gebunden wird, da nach schonender Hydrolyse des DFP-gehemmten Enzyms Serinphosphat isoliert wurde

(26). Auf Grund der pH-Abhängigkeit der DFP-Hemmung und der Hydrolyse von Estersubstraten wurde die Beteiligung eines Histidinrestes am Reaktionsgeschehen angenommen (26). Nach Umsetzung von Kallikrein und Trypsin mit Diisopropylfluoro(^{32}P)-phosphat und partieller Säurehydrolyse wurden die elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten der radioaktiv markierten serinhaltigen Peptide miteinander verglichen (27). Dabei zeigte sich, daß Kallikrein mit größter Wahrscheinlichkeit die gleiche Sequenz Asp-Ser-Gly im aktiven Zentrum aufweist wie Trypsin und somit auch wie die anderen Serinproteasen des Pankreas, Chymotrypsin und Elastase.

Molekulargewicht, Aminosäurezusammensetzung

Die mittels der Ultrazentrifuge erhaltenen Werte für das Molekulargewicht des Kallikreins variieren in einem weiten Bereich. So fand Habermann (12) Werte zwischen 23 000 und 24 000, Moriya in früheren Experimenten 33 000 (28) sowie neuerdings 25 200 (14) und Scholtan 29 000 (13).

In unserem Institut wurde das Molekulargewicht sialinsäurefreien Kallikreins zunächst durch Gelfiltration mit ca. 35 000 festgelegt (29). Dieser Wert könnte jedoch zu hoch liegen, da Glykoproteine dazu neigen, bei der Abschätzung des Molekulargewichtes mit Hilfe der Gelfiltration zu hohe Werte zu ergeben (30). Die auf den Ergebnissen der Gelfiltration beruhende Be-

rechnung der Aminosäurezusammensetzung lieferte mit 283 Resten und dem Kohlehydratgehalt einer Mischung von Kallikrein A und B ein Molekulargewicht zwischen 33 400 und 33 800 (13). Dabei wurde ein Gehalt von vier Argininresten ermittelt.

Die Titration des aktiven Zentrums mit p-NPGB in unserem Arbeitskreis (31) führte auf ein Molekulargewicht von $24\,000 \pm 860$ für den Proteinanteil des Kallikreins. Eine neu durchgeführte Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung (18), berechnet auf der Grundlage eines Gehaltes von drei Argininresten pro Kallikreinmolekül, ergab für den Proteinanteil des Enzyms ein Molekulargewicht von 25 300 (Tab.3). Der hierbei ermittelte Gehalt von 229 Aminosäureresten pro Kallikreinmolekül steht in guter Übereinstimmung mit der Zusammensetzung anderer Serinproteasen des Pankreas wie z.B. der des Schweinetrypsins mit 223 Resten (32). Nach Berücksichtigung der Kohlehydratbestandteile (Tab.1) errechnet sich somit für Kallikrein A ein Molekulargewicht von 26 800 und für Kallikrein B ein solches von 28 600.

Endgruppen

Die Bestimmung der Carboxyl- und der Aminoendgruppen des Kallikreins in unserem Arbeitskreis (18) wurde mit Hilfe der Hydrazinolyse bzw. mittels der Cyanatmethode durchgeführt (Tab.4). Als C-terminale Aminosäuren fanden sich etwa ein Rest Prolin und je ca. ein halber Rest Serin bzw. Leucin. Isoleucin und

Tab.3 Aminosäurezusammensetzung von Kallikrein und Trypsin
des Schweines

Aminosäuren	Reste pro Molekül	
	Kallikrein (18)	Trypsin (32)
Asp	27	24
Thr	14	10
Ser	14	27
Glu	23	17
Pro	16	9
Gly	22	25
Ala	13	15
Cys/2	10	12
Val	10	16,4
Met	4	2
Ile	12	15,6
Leu	19	16
Tyr	7	8
Phe	10	4
Lys	10	10
His	8	4
Arg	3	4
Trp	7	4
Summe	229	223

Alanin wurden im Verhältnis 1:1 als Aminoendgruppen nachgewiesen.

Trypsin enthält ebenfalls die Aminoendgruppe Isoleucin als Ergebnis der proteolytischen Aktivierung durch Spaltung der Bindung Lys(6)-Ile(7) des Trypsinogens (33). Analog zur aktiven zweikettigen Form -Trypsin ließ das Auftreten von zwei Aminoendgruppen auf einen Aufbau des Kallikreins aus zwei Polypeptidketten nach der Aktivierung durch Pankreasautolyse schließen.

Tab.4 Amino- und Carboxylendgruppen des Kallikreins (18)
(Reste pro Molekül)

Aminosäuren	Amino- endgruppen	Carboxyl- endgruppen
Asp	0,11	
Ser		0,24
Pro		0,71
Gly		0,07
Ala	0,81	0,08
Val	0,10	
Ile	0,85	
Leu		0,39

II. Zielsetzung und Strategie

In den bisherigen Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß Kallikrein deutliche Ähnlichkeiten mit den Serinproteasen des Pankreas aufweist. Die Aminosäuresequenzen von Trypsin, Chymotrypsin und Elastase sind aufgeklärt (34). Sie zeigen untereinander ausgeprägte Homologien (35,36). Diese enge strukturelle Beziehung läßt auf die gemeinsame Abkunft aus einem sehr alten Gen schließen, das durch Duplikationen vor etwa 1,5 Milliarden Jahren in die Gene der einzelnen Enzymgruppen aufgespalten wurde (34). Um die phylogenetischen Beziehungen des Kallikreins zu den anderen Serinproteasen untersuchen zu können, ist die Kenntnis seiner Aminosäuresequenz eine notwendige Voraussetzung.

Eine interessante Eigenschaft des Kallikreins liegt in der engen Spezifität seiner proteolytischen Wirkung, die speziell der Hydrolyse von Kininogen angepaßt zu sein scheint. In dieser Hinsicht ist es der Serinprotease Thrombin (37) vergleichbar. Der Grund dafür dürfte darin liegen, daß das Kallikreinmolekül zusätzlich zum aktiven Zentrum weitere Bindungsstellen für sein Substrat aufweist. Die Frage, um welche Kontaktpunkte es sich dabei handelt, kann nur aus der Kenntnis der Tertiärstruktur des Enzyms heraus beantwortet werden. Die inzwischen aufgeklärten dreidimensionalen Strukturen von Trypsin (38), Chymotrypsin (39) und Elastase (40) sind einander sehr ähnlich. Somit bestä-

tigt sich die Annahme, daß ausgeprägte Homologien in der Aminosäuresequenz eine ebenfalls homologe Tertiärstruktur bedingen. Am Beispiel des Thrombins wurde auf Grund dieser Tatsache versucht, eine mögliche Konformation abzuschätzen und daraus eine Antwort auf die Frage nach dem Grund für die hohe Spezifität dieses Enzyms abzuleiten (41). Ein ähnliches Vorgehen könnte auch beim Kallikrein zur Klärung dieser Frage beitragen. Weiterhin ist die Kenntnis der Aminosäuresequenz eine notwendige Voraussetzung für die Bestimmung der Tertiärstruktur eines Proteins mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse. Somit schien es uns lohnend, die Untersuchung der Primärstruktur des Kallikreins in Angriff zu nehmen.

Die herkömmliche Technik der Sequenzanalyse ist äußerst zeitraubend und mühevoll. Mit der Automatisierung dieser Tätigkeit durch Edman und Begg (42) ergab sich ein bedeutender Fortschritt. Deshalb wurden die eigentlichen Sequenzanalysen im Verlaufe der Strukturuntersuchungen am Kallikrein im Labor von Dr. H. Tschesche (TU München) durchgeführt, dem neben einem automatischen Sequenator nach Edman auch die Möglichkeit zur massenspektrometrischen Identifizierung der entstandenen Phenylthiohydantoine zur Verfügung steht. Sämtliche nicht unmittelbar die Sequenzanalyse beinhaltenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, d.h. die Fragmentierung des Kallikreins in geeignete Bruchstücke, die Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der erhaltenen

Peptide durch Aminosäureanalysen, Elektrophoresen, Endgruppenanalysen etc. stammen aus eigenen Untersuchungen.

Dazu wurde von Dr. C. Kutzbach und Dr. G. Schmidt-Kastner (Farbenfabriken Bayer AG) Kallikrein B zur Verfügung gestellt (15), das zur Abspaltung von Sialinsäureresten, die möglicherweise eine chromatographische Heterogenität von Peptiden bewirkt hätten, mit Neuraminidase behandelt worden war. Die meisten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an einer Kallikreincharge ausgeführt, die unter der Bezeichnung Kallikrein B, batch IV, in (18) näher charakterisiert ist.

Die beabsichtigte automatische Sequenzierung bestimmte den Plan des Vorgehens, da mit dieser Technik die Analyse wesentlich längerer Teilsequenzen als nach der herkömmlichen Methode möglich wurde. Wir wollten deshalb durch eine stufenweise Zerlegung des Kallikreins in jeweils nur wenige größere Bruchstücke leicht in die Sequenz einzuordnende Peptide gewinnen, die für die automatische Sequenzanalyse geeignet waren. Eine vollständige enzymatische Hydrolyse in viele kleine Bruchstücke mit den daraus resultierenden Schwierigkeiten bei der Peptidisolierung und -zuordnung sollte damit vermieden werden.

Die kontrollierte stufenweise Fragmentierung des Gesamtmoleküls eröffnet weiterhin die Möglichkeit, bestimmte Peptide etwa nach chemischer Modifikation einzelner Aminosäuren gezielt zu isolieren.

Durch Aminoäthylierung der Cysteingruppen nach Reduktion der Di-

sulfidbrücken wollten wir zunächst zusätzliche Angriffsstellen für Trypsin schaffen (43). Nach Trennung der auf Grund der Endgruppenanalysen erwarteten beiden Ketten des Kallikreins sollte durch reversible Acylierung aller Aminogruppen mit Maleinsäureanhydrid der tryptische Angriff auf die drei Argininreste des Kallikreinmoleküls beschränkt werden (44). Nach Deacylierung und Trennung der Peptide sollten unter pH-Kontrolle weitere tryptische Spaltungen möglichst spezifisch an Lysin bzw. Aminoäthylcystein erfolgen (45). Als weitere Möglichkeit zur gezielten Isolierung einer geringen Zahl größerer Bruchstücke bot sich die Spaltung an den vier Methioninresten des Kallikreins mit Hilfe von Bromcyan an (46).

III. Untereinheiten des Kallikreins

1. Reduktion und Aminoäthylisierung

Auftrennung durch Gelfiltration

Der Nachweis von zwei Aminoendgruppen im Kallikreinmolekül (Tab. 4) hatte vermuten lassen, daß aktives Kallikrein aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Peptidketten besteht. Nach Reduktion mit Mercaptoäthanol und Alkylierung mit Äthylenimin wurde durch Gelfiltration über Sephadex G-75 eine Auftrennung in drei proteinhaltige Fraktionen erreicht, die wir mit A, B und C bezeichneten (Abb.1). Der vierte Gipfel um Fraktion 100 enthielt neben Salzen und Reagentien keine nennenswerten Mengen an Aminosäuren.

SDS-Elektrophorese

Bei der Untersuchung der drei Fraktionen auf einheitliche Molekülgröße mit Hilfe der SDS-Elektrophorese in harnstoffhaltigen Gelen (Abb.2) lieferte das Material des Gipfels B eine einzige Bande. Auch die Fraktion A war weitgehend einheitlich, wies jedoch neben der Hauptzone noch zwei schwache Nebenbanden, eine

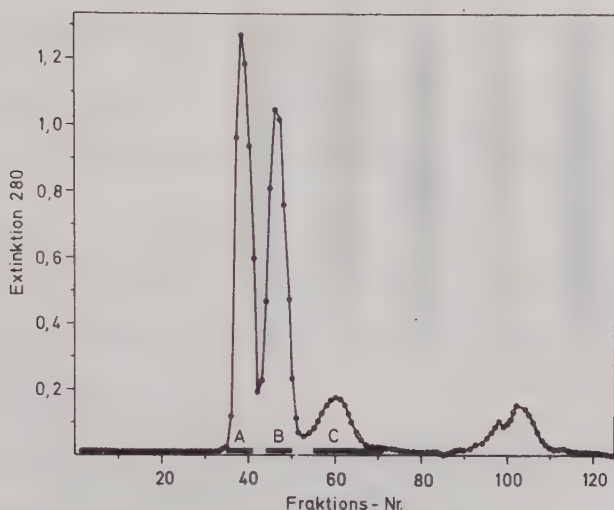


Abb.1 Trennung der Fragmente reduzierten und aminoäthylierten Kallikreins ($0,89 \mu\text{Mol}$) durch Gelfiltration an Sephadex G-75 ($150 \times 2 \text{ cm}$)

Die Säule war mit $0,1 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ (pH 9) äquilibriert und wurde mit ca. 12 ml/h betrieben; Fraktionen von $4,2 \text{ ml}$ wurden gesammelt;

davon in Höhe des B-Materials auf. Dies deutete auf eine gewisse Verunreinigung durch die Komponente B hin. Überraschenderweise war die elektrophoretische Beweglichkeit der Hauptbande des A-Peaks wesentlich größer als diejenige des B-Peaks. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Gelfiltration ließ dieses Verhalten auf

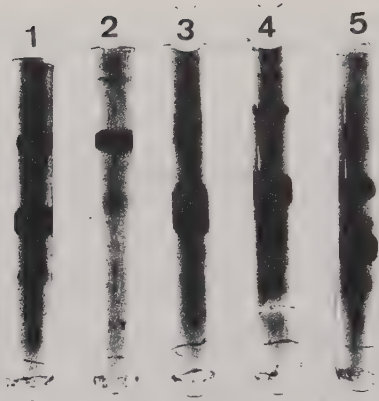


Abb.2 SDS-Elektrophorese (30 V, 18 h) der Fraktionen A,B und C (Gele 1,2 und 3) der Abb.1 sowie von Cytochrom c (Gel 4) und reduziertem α -Chymotrypsin (Gel 5).
Das Molekulargewicht von Cytochrom c (Schwein) beträgt 12 200 (47), von B- und C-Kette des α -Chymotrypsins (Rind) 13 900 bzw. 10 200 (48).

ein wesentlich kleineres Molekulargewicht der A-Komponente im Vergleich zum Material des B-Peaks schließen. Wie im Folgenden beschrieben, konnten die beiden Fraktionen A und B als die beiden Ketten identifiziert werden. Entsprechend ihrer Elutionsreihenfolge wurden sie mit A- und B-Kette bezeichnet. Die Abschätzung ihres Molekulargewichtes in der SDS-Elektrophorese durch den Vergleich mit einer Anzahl von Eichproteinen ergab

ungefähre Werte von 10 000 für die A-Kette und 22 000 für die B-Kette. Demnach läßt sich das Verhalten der A-Kette bei der Gelfiltration, wobei das Material beim Ausschlußvolumen der verwendeten Säule eluiert worden war, nur durch eine starke Aggregationsneigung unter den angegebenen Bedingungen erklären.

Das Material der Fraktion C zeigte in der SDS-Elektrophorese zwei dicht beieinander liegende Banden. Die weiter gewanderte der beiden Banden entsprach in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit etwa der A-Kette, wie es aus der Elutionsposition der Fraktion C bei der Gelfiltration zu erwarten war. Die Fraktion C mußte demzufolge verschiedene Komponenten von ähnlicher Molekülgröße wie die A-Kette enthalten.

Aminosäureanalysen von Einzelfractionen

Zur weiteren Prüfung der Einheitlichkeit der Zusammensetzung der drei Fraktionen A,B und C wurden jeweils Aminosäureanalysen von Material aus dem ansteigenden Ast, dem Gipfel und dem absteigenden Ast eines jeden Peaks durchgeführt (Tab.5). Die Ergebnisse sind für A- und B-Kette als Reste pro Molekül auf der Grundlage der später bestätigten Zusammensetzung (Tab.8 und 9) ausgedrückt; in den Analysen des C-Peaks wurde Glycin willkürlich gleich 100 gesetzt und die anderen Aminosäuren relativ dazu angegeben. Beide Ketten zeigten über den ganzen Peak hinweg jeweils eine weitgehend einheitliche Zusammensetzung, während die Aminosäureana-

Tab. 5

Überprüfung der Einheitlichkeit der Fraktionen A, B und C der Abb. 1 durch Aminosäureanalysen (Zwei-Säulen-System; basische Aminosäuren wurden nicht bestimmt) jeweils des aufsteigenden Astes, des Gipfels und des absteigenden Astes einer jeden Fraktion.

In A- und B-Peak sind jeweils Aminosäurereste pro Mol Kette angegeben; im C-Peak bildet Gly = 100 den Bezugswert.

Aminosäuren	A-Peak			B-Peak			C-Peak			! </th
	aufsteigend	Gipfel	absteigend	aufsteigend	Gipfel	absteigend	aufsteigend	Gipfel	absteigend	
Asp	10,08	9,83	10,04	17,41	18,01	16,87	114	87	101	!
Thr	3,45	3,39	3,44	11,59	12,28	11,88	68	64	61	
Ser	3,38	3,44	3,60	9,16	9,24	9,13	60	50	50	
Glu	8,47	8,16	8,06	14,87	15,06	15,09	99	65	72	
Pro	4,07	4,47	4,18	11,18	12,12	10,21	65	52	50	
Gly	7,48	7,37	7,35	14,67	14,92	14,66	100	100	100	
Ala	5,09	4,98	4,94	7,61	7,72	7,72	52	39	46	
Val	5,96	5,75	5,69	4,33	4,16	4,21	37	33	44	
Met	0,07	0,03	0,11	2,80	3,35	3,19	14	15	11	
Ile	2,37	2,25	2,25	7,97	8,41	8,13	47	46	41	
Leu	5,08	4,93	4,75	13,29	13,97	13,63	80	55	53	
Tyr	2,80	2,75	2,70	3,88	3,95	3,80	28	31	31	
Phe	5,65	5,58	5,43	4,26	4,11	4,08	37	33	40	

lysen des C-Peaks, wie bereits die Ergebnisse der SDS-Elektrophorese, auf deutliche Heterogenität schließen ließen.

Endgruppenbestimmung

Die qualitative Bestimmung der Aminoendgruppen an Material der drei Fraktionen A,B und C wurde nach der Dansylmethode durchgeführt. Die A-Kette zeigte im 4-h-Hydrolysat neben wenig Isoleucin einen stark fluoreszierenden Fleck, der keiner bekannten Aminosäure zuzuordnen war. Im 20-h-Hydrolysat nahm die Intensität des unbekannten Flecks ab, diejenige des Isoleucins jedoch zu. Die spätere Sequenzanalyse bestätigte mit N-terminalem Ile-Ile die Vermutung, daß es sich bei der zusätzlichen unbekannten Endgruppe um ein schwer hydrolysierbares Dipeptid mit aminoendständigem Isoleucin handelte. Alanin, die zweite der im Kallikrein vorkommenden Aminoendgruppen, konnte mit Hilfe der Dansylmethode als einziger N-Terminus der B-Kette nachgewiesen werden. Die bereits durch SDS-Elektrophorese (Abb.2) und Aminosäureanalysen (Tab.5) aufgezeigte Heterogenität des C-Peaks bestätigte sich auch bei der Endgruppenbestimmung. Mit Ala, Ile (zusammen mit dem vermutlichen Dipeptid) und zusätzlichem Val ergaben sich drei N-terminale Aminosäuren in vergleichbaren Mengenverhältnissen.

Die quantitative Bestimmung der Amino- und Carboxylendgruppen sollte über die bloße Charakterisierung der endständigen Aminosäurereste hinaus ein zusätzliches unabhängiges Maß für die Rein-

heit und ungefähre Größe einer Peptidkette liefern. Nach der Cyanatmethode wurden deshalb Analysen der Aminoendgruppen beider Ketten durchgeführt. Die Untersuchung der B-Kette ergab aus technischen Gründen kein quantitativ auswertbares Resultat, zeigte jedoch qualitativ ebenfalls Alanin als hauptsächliche Aminoendgruppe. Legt man für die Berechnung das sich aus der in Tab.8 angegebenen Aminosäurezusammensetzung folgende Molekulargewicht der A-Kette zugrunde, so ergeben sich als deren hauptsächliche N-terminale Aminosäure 0,87 Reste von Ile (Tab.6). Isoleucin war ebenfalls schon früher als eine der beiden N-terminalen Gruppen des Kallikreins aufgefunden worden. Wegen der relativ hohen Blindwerte (18) der Bestimmungsmethode ist es unsicher, ob die übrigen angefallenen Aminosäuren ebenfalls als Endgruppen vorkommen oder nur methodische Artefakte darstellen. Jedenfalls ist ihre Menge sehr gering, was eine weitere Bestätigung für die weitgehende Einheitlichkeit des im A-Peak isolierten Materials darstellt.

Die quantitative Bestimmung der Carboxylendgruppen des Kallikreins, der A- und der B-Kette (Tab.6) sowie der Fraktion C (Tab.12) wurde mittels der Hydrazinolyse durchgeführt. Bei der verwendeten Methode wurden eventuelle C-terminale Reste von Asn, Gln, Trp und den basischen Aminosäuren nicht erfaßt. Die Tabellen enthalten die Ergebnisse der 48-h-Hydrazinolysen. Die jeweils zusätzlich durchgeführten 72-h-Hydrazinolysen brachten keine weitere Zunahme der Ausbeuten. Die Prolinendgruppe des Kallikreins fin-

det sich mit praktisch gleicher Ausbeute in der B-Kette. Die A-Kette enthält die im Kallikrein aufgefundenen Carboxylendgruppen Serin und Leucin, deren Summe etwa der Menge Prolin in der B-Kette entspricht. Das Ergebnis der Sequenzanalyse mit Leu-Ser als C-terminaler Sequenz erhärtet die Vermutung, daß diese Heterogenität des C-Terminus auf die Einwirkung von Carboxypeptidasen während der Pankreasautolyse auf die hierbei freigesetzte Carboxylendgruppe der A-Kette zurückzuführen ist. Auch hier bestätigt sich die Heterogenität des C-Peak-Materials. Hierauf wird unter III.5 näher eingegangen.

2. Reduktion und Carboxymethylierung

Auftrennung durch Gelfiltration

Die weiter unten beschriebenen Ergebnisse der Trypsin- und Bromcyanspaltung aminoäthylierter A- bzw. B-Kette erforderten einen Wechsel von Äthylenimin zu Jodessigsäure als Alkylierungsmittel, sodaß der weitaus überwiegende Teil der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an carboxymethyliertem Material durchgeführt wurde. Wegen der Gefahr von Nebenreaktionen wie z.B. der Sulfoniumsalzbildung an Methioninresten (49) wurde Jodessigsäure in äquivalenter Menge zu Mercaptoäthanol verwendet.

Das Elutionsdiagramm der Auftrennung reduzierten carboxymethy-

Tab.6 Aminoendgruppen der A-Kette (AE) nach der Cyanatmethode und Carboxylendgruppen des Kallikreins, aminoäthylierter A- und B-Kette nach Hydrazinolyse (jeweils Reste pro Molekül; Werte kleiner als 0,02 wurden nicht angegeben).

Aminosäuren	N-Term. A-Kette	C-Terminus		
		Kallikrein	A-Kette	B-Kette
Asp		0,03		0,04
Thr	0,02	0,03		0,02
Ser		0,24	0,19	0,07
Glu	0,04			
Pro		0,71		0,69
Gly	0,07	0,06	0,03	0,06
Ala		0,08	0,09	0,02
Val		0,02		
Ile	0,87	0,02		
Leu		0,34	0,42	

lierten Kallikreins durch Gelfiltration bei pH 7 glich mit dem Auftreten des A-Peaks beim Ausschlußvolumen der Säule demjenigen reduzierten, aminoäthylierten Kallikreins bei pH 9, jedoch mit dem Unterschied, daß statt eines einheitlichen C-Gipfels die beiden Peaks C und D gefunden wurden (Abb.3).

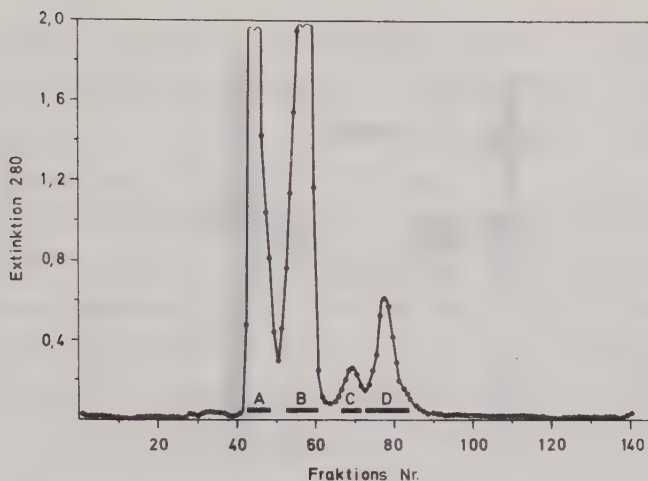


Abb.3 Trennung der Fragmente reduzierten und carboxymethylierten Kallikreins (94,4 mg) durch Gelfiltration an Sephadex G-75 (200 x 2 cm). Die Säule war mit 0,1 M NH_4HCO_3 (pH 7) äquiliбриert und wurde mit ca. 15 ml/h betrieben; Fraktionen mit 3,8 ml wurden gesammelt.

Elektrophoresen

Wie bei der SDS-Elektrophorese des aminoäthylierten Materials wies die Bande der Fraktion A auch carboxymethyliert eine wesentlich größere elektrophoretische Beweglichkeit als diejenige der Fraktion B auf (Abb.4). Die Laufstrecken der Hauptbanden der Fraktionen A und B entsprachen den beiden Komponenten



Abb.4 SDS-Elektrophorese (ca. 30 V, 17 h) von reduziertem Kallikrein (Gel 1), carboxymethylierter A- (Gel 2) und B-Kette (Gel 3) sowie den Fraktionen C (Gel 4) und D (Gel 5) der Abb.3.

mit Dithioerythrit reduzierten Kallikreins. Somit mußte auch nach Reduktion und Carboxymethylierung des Kallikreins die B-Kette entsprechend ihrer Größe, die kleinere A-Kette jedoch in stark aggregierter Form von der Säule eluiert worden sein.

Das Auftreten einer einzigen Zone bei der SDS-Elektrophorese der B-Kette zeigte die hohe Reinheit dieses Materials bereits nach der Isolierung durch Gelfiltration. Die A-Kette enthielt

nur noch sehr schwache zusätzliche Banden und erschien somit ebenfalls als weitgehend homogen. Das Material von C- und D-Peak ergab bei dieser Trennung nach der Molekülgröße jeweils eine einzige Zone in der Gegend der A-Kette.

Auch bei einer Trennung entsprechend den Ladungsverhältnissen des Materials durch Disk-Elektrophorese in harnstoffhaltigen Gelen ohne SDS-Zusatz (Abb.5) ließ das Resultat der B-Kette wiederum auf vollständige, das der A-Kette auf weitgehende Einheitlichkeit schließen. Deutliche Heterogenitäten zeigten sich in den Fraktionen C und D.



Abb.5 Disk-Elektrophorese (45 V, 16 h) von carboxymethylierter A- (Gel 1) und B-Kette (Gel 2), von Fraktion C (CM) (Gel 3) und D (CM) (Gel 4)

3. Weitere Trennsysteme

Gelfiltration

Da die Gefahr der Deamidierung von Asparagin- und Glutaminresten während der Trennung aminoäthylierten Materials bei pH 9 nicht unerheblich schien (50), wurde versucht, dafür durch Wahl eines niedrigeren pH-Wertes schonendere Bedingungen zu verwenden. Jedoch ergab sich bei zwei Gelfiltrationen reduzierten, aminoäthylierten Kallikreins ($0,02 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$, pH 7 und $1 \text{ M Ammoniumacetat}$, pH 6,5) statt einer Auftrennung die Elution fast des gesamten Materials in einem einzigen Gipfel. Bei Verwendung von $0,2 \text{ N}$ Essigsäure als Elutionsmittel waren die Ergebnisse wegen Schwierigkeiten mit der Löslichkeit des Materials ebenfalls unbefriedigend. Um diese Tendenz zur Unlöslichkeit herabzusetzen, wurde die Gelfiltration reduzierten und aminoäthylierten Kallikreins in 50% Essigsäure durchgeführt. An Sephadex G-150 konnte dabei eine gegenüber Sephadex G-75 geringfügig verbesserte Auftrennung in zwei proteinhaltige Fraktionen erreicht werden (Abb.6). Der Peak um Fraktion 90 enthielt nur Salze und Reagentien. Zur Prüfung der Einheitlichkeit wurden wiederum jeweils Aminosäureanalysen des aufsteigenden Astes, der Gipfelfraktion und des absteigenden Astes beider Peaks durchgeführt (Tab.7). Die B-Kette fand sich demnach im ersten Gipfel und erwies sich als einheitlich, wogegen die A-Kette, die im zweiten Gipfel aufgefunden wurde, deutliche Heterogenität zeigte. Die starke Abnahme des Gehaltes

an Valin und Phenylalanin - beides Reste, die in der A-Kette relativ zu ihrer Größe wesentlich häufiger auftreten als in der B-Kette - weist gemeinsam mit dem zunehmenden Methionin-gehalt auf das Vorkommen von Material des C-Peaks unter der abfallenden Flanke der Fraktion A hin, wie es den Ergebnissen der SDS-Elektrophorese zufolge bei der Elution monomerer A-Kette und C-Material entsprechend ihrer tatsächlichen Größe zu erwarten war. Da diese Heterogenität des 2. Gipfels die

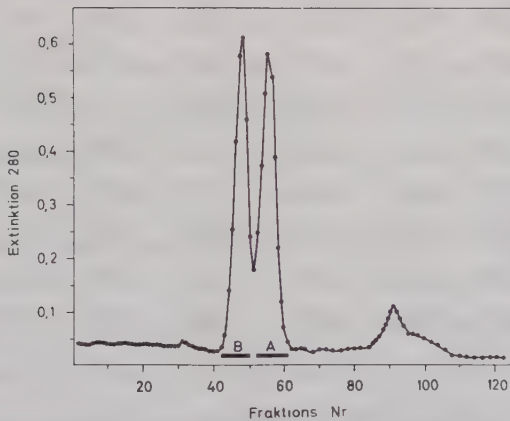


Abb.6 Gelfiltration reduzierten und amino-
äthylierten Kallikreins (13,3 mg) an
Sephadex G-150 (150 x 2 cm) in 50 %
Essigsäure.
Die Säule wurde mit ca. 10 ml/h eluiert
und Fraktionen mit 3,0 ml gesammelt.

Tab.7 Aminosäureanalyse einzelner Fraktionen der Abb.6 (Zwei-Säulen-System; basische Aminosäuren wurden nicht bestimmt); angegeben sind jeweils Reste pro Molekül B-Kette (B-Peak) bzw. A-Kette (A-Peak).

Aminosäuren	Peak B			Peak A		
	Fr.45	Fr.47	Fr.49	Fr.54	Fr.56	Fr.58
Asp	17,52	17,44	17,46	9,98	9,82	9,89
Thr	11,87	12,28	12,07	3,46	3,97	5,39
Ser	8,56	8,33	8,60	3,19	3,40	3,93
Glu	15,05	15,23	15,07	8,30	8,34	8,21
Pro	10,21	10,00	10,12	3,57	4,16	4,71
Gly	14,79	14,68	14,63	7,05	7,23	7,94
Ala	7,94	7,78	7,75	4,95	4,86	4,57
Val	4,05	4,08	4,12	5,82	5,17	3,85
Met	1,96	1,92	1,97	< 0,02	0,18	0,23
Ile	8,29	8,43	8,38	2,34	2,85	3,79
Leu	14,02	14,12	14,08	4,98	5,55	6,47
Tyr	3,67	3,77	3,76	2,63	2,56	2,19
Phe	3,88	3,93	4,05	5,67	4,98	3,70

Verwendung von 50 % Essigsäure als Elutionsmittel nicht geraten erscheinen ließ, wurde in weiteren präparativen Auftrennungen reduzierten und aminoäthylierten ebenso wie carboxymethylierten Kallikreins die Aggregationsneigung der A-Kette zur Abtrennung

von C-Material genutzt und die Gelfiltration in 50 % Essigsäure nur gelegentlich zur weiteren Reinigung derart isolierter Ketten verwendet.

Ionenaustausch-Chromatographie

Als Alternative zur weiteren Reinigung durch eine zweite Gelfiltration wurde carboxymethylierte B-Kette an DEAE-Sephadex A-25 rechromatographiert (Abb.7) (Rechromatographie B-Kette amino-äthyliert vgl. Kap. V).

Carboxymethylierte A-Kette konnte weder unter Verwendung eines KCl-Gradienten bei pH 7 noch eines TEAA-Konzentrationsgradienten bei pH 6 von einer DEAE-Säule desorbiert werden. Da sich später in dem Bromcyanpeptid CB-II der B-Kette ebenfalls ein zur Aggregation neigendes und in wässrigen Lösungsmitteln nicht chromatographierbares Peptid fand, wurde für die Rechromatographie der A-Kette auch ein System untersucht, das die Reinigung dieses Bromcyanpeptides mit guter Ausbeute ermöglicht hatte (SP-Sephadex C-25; HAc 50 %, schwach gepuffert mit 0,05 M NaOH; Konzentrationsgradient von 0 bis 0,5 M NaCl; vgl. Kap. V). Doch selbst in diesem System wurden nur ca. 10 % der eingesetzten Menge an carboxymethylierter A-Kette wieder eluiert, so daß als einzige Methode zur weiteren Reinigung nicht ganz einheitlich erhaltener A-Kette eine nochmalige Gelfiltration in 50 % Essigsäure blieb.

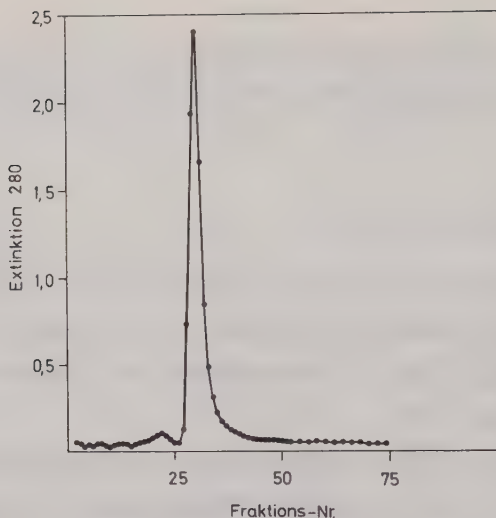


Abb.7 Chromatographie carboxymethylierter B-Kette an DEAE-Sephadex A-25 (37 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 - 1 M KCl in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0. Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 250 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 9 ml/h und die Fraktionsgrösse 3,2 ml.

4. Aminosäurezusammensetzung der Ketten

A-Kette

Aus der Molekulargewichtsbestimmung durch die SDS-Elektrophorese und dem Ergebnis der quantitativen Aminoendgruppenbestimmung folgte, daß die A-Kette wahrscheinlich zwei Argininreste ent-

hält. Bei der Berechnung der Aminosäurezusammensetzung der A-Kette auf dieser Grundlage (Tab.8) ergibt sich eine weitgehende Ganzzahligkeit der meisten Aminosäurereste und somit eine gute Bestätigung dieser Annahme.

Da in der A-Kette offensichtlich kein Methionin enthalten ist, wurde als Maß für die Verunreinigung von A-Ketten-Material der Restgehalt an Methionin angesehen. So zeigte sich der Reinigungseffekt einer zusätzlichen Gelfiltration aminoäthylierter A-Kette über Sephadex G-75 in 50 % Essigsäure vor allem durch einen Rückgang des Methioningehaltes auf ein Zehntel seines ursprünglichen Wertes (Spalten 1 und 2 der Tab.8). Einen ähnlich geringen Methioningehalt und somit einen vergleichbaren Reinheitsgrad weist carboxymethylierte A-Kette bereits nach der Auftrennung des Reduktionsansatzes durch die Gelfiltration auf (Spalten 3 und 4 der Tab.8). Wie das aminoendständige Ile-Val Dipeptid des Trypsins (51) wird die entsprechende Ile-Ile Bindung des Kallikreins erst durch stark verlängerte Hydrolysezeiten vollständig gespalten. Der halbe Serinrest, der in aminoäthylierter wie carboxymethylierter A-Kette aufgefunden wurde, ließ zusammen mit dem Auftreten der beiden Carboxylgruppen Leucin und Serin (Tab.5) auf eine C-terminale Leu-Ser Sequenz schließen. Die Summe der Aminosäurereste aller tryptischen Peptide der A-Kette sowie das Ergebnis der Sequenzanalyse decken sich vollständig mit der durch Aminosäureanalyse bestimmten Zusammensetzung (Spalten 6 und 7 der Tab.8). Somit läßt sich für

Tab.8 Aminosäurezusammensetzung der A-Kette (Reste pro Molekül)

Aminosäuren	1 AE (Abb.1) ^a	2 AE rechrom. in HAc 50% ^b	3 CM (Abb.3) ^c	4 CM (Abb.3) ^d	5 Reste ganz- zahlig	6 Summe d. trypt. Peptide	7 Sequenz
Asp	9,96	9,98	9,73	9,71	10	10	10(8AsN)
Thr	3,29	3,05	2,90	2,99	3	3	3
Ser	3,83	3,42	3,39	3,39	3,5	3,5	3-4
Glu	8,15	8,13	8,09	8,16	8	8	8(3GIN)
Pro	4,00	3,97	3,88	4,31	4	4	4
Gly	7,26	7,11	7,13	7,04	7	7	7
Ala	5,01	5,01	5,03	5,03	5	5	5
Cys/2	2,02	2,37	3,01	3,01	3	3	3
Val	5,61	6,04	6,05	5,97	6	6	6
Met	0,21	0,02	0,02	<0,02 ^f	0	0	0
Ile	2,35	2,85 ^e		2,87	3	3	3
Leu	5,17	4,70		4,72	3	3	3
Tyr	2,83	2,97	3,09	2,99	3	3	3
Phe	5,61	6,05	6,26	6,01	3	3	3
Lys	3,03	2,79	3,02	2,99	3	3	3
His	4,83	4,89	4,93	5,07	3	3	3
Arg	2,15	1,96	1,91	1,97	5	5	5
Trp				2,85	2	2	2
Glucos-amin	(1,49)	(1,55)		4,10	3	3	3

- a Zwei-Säulen-System; saure und neutrale AS Mittelwert aus zwei Analysen;
b Zwei-Säulen-System; alle AS Mittelwert aus zwei Analysen;
c Ein-Säulen-System; alle AS Mittelwert aus zwei Analysen;
d Zwei-Säulen-System; Lys, His, Arg, Trp und Glucosamin aus 24-h-Toluolsulfonsäurehydrolyse;
e aus 120-h-HCl-Hydrolyse;
f aus 140-h-HCl-Hydrolyse;

das Molekulargewicht des Proteinteils der A-Kette je nach C-terminalem Seringehalt ein Wert von 9026 bzw. 9113 Dalton errechnen.

B-Kette

Im Gegensatz zur A-Kette hatte weder aminoäthylierte noch carboxymethylierte B-Kette bei der Elektrophorese nennenswerte Beimengungen anderen Materials erkennen lassen (Abb.2, 4 und 5); die Rechromatographie carboxymethylierter B-Kette an DEAE-Sephadex (Abb.7) führte ebenfalls zu keiner erkennbaren Abtrennung von Nebenkomponten. Aus den Aminosäureanalysen ergab sich als Basis für die Berechnung der Zusammensetzung notwendigerweise das Vorkommen eines einzigen Argininrestes in der B-Kette, da die Annahme von zwei oder mehr Argininresten zu einer Verdoppelung bzw. Vervielfachung der als Minimalzusammensetzung ermittelten ca. 150 Aminosäurereste und damit zu einem für ein Kallikreinfragment viel zu hohen Molekulargewicht geführt hätte (Tab.9). Wie der Vergleich der letzten beiden Spalten der Tab.9 zeigt, deckt sich die aus den Aminosäureanalysen ermittelte Zusammensetzung der B-Kette mit Ausnahme jeweils eines Restes von Isoleucin bzw. Leucin mit derjenigen Zusammensetzung der B-Kette, die sich aus der Summe der Peptide ergibt, welche aus der B-Kette isoliert und ihrer Reihenfolge nach in das Molekül eingeordnet werden konnten (vgl. Kap. V).

Eine Schwierigkeit bei der Bestimmung der Anzahl der Asparagin-

säurereste verdient Erwähnung. Zunächst gestatteten weder die Aminosäureanalysen der B-Kette selbst noch die Summe aller Asparaginsäurereste der Peptide der B-Kette die Entscheidung zwischen einem Gehalt von 17 oder 18 Resten. Dafür konnten die prinzipiellen Schwierigkeiten bei der exakten Bestimmung einer größeren Anzahl von Aminosäureresten nicht die Ursache sein, da sich die Unklarheit im Asparaginsäuregehalt der B-Kette bis auf den konstanten Wert von 3,5 Resten Asp in dem verhältnismäßig kleinen 16-Reste-Peptid CB-II-T-1 zurückführen ließ.

Obwohl der Grund für die Ungeradzahligkeit bei der Bestimmung des Asparaginsäuregehaltes dieses Peptides nicht klar wurde, zwang das Ergebnis der Sequenzanalyse dieses Peptides zur Annahme eines Gehaltes von 4 Asx-Resten (s. Kap.V), so daß der Gehalt der B-Kette an Asparagin und Asparaginsäure insgesamt 18 Reste beträgt. Damit ergibt sich, daß die B-Kette 152 Aminosäuren enthält und ein Molekulargewicht des Proteinteils von ca. 16 500 Dalton aufweist.

Das vollständige Verschwinden des Cystinpeaks im Aminosäurechromatogramm nach Reduktion und Alkylierung des Kallikreins ließ auf eine vollständige Spaltung der Disulfidbrücken und Blockierung der Sulfhydrylgruppen schließen, zumal da Aminoäthyl- bzw. Carboxymethylcystein die einzigen zusätzlich auftretenden Peaks bei der Aminosäureanalyse waren. Im Gegensatz zu den Carboxymethylcysteinwerten ergab die Summe des Aminoäthylcysteins der A- und der B-Kette einen wesentlich niedrigeren Gehalt als jene

Tab.9 Aminosäurezusammensetzung der B-Kette
(Reste pro Molekül)

	1	2	3	4	5
Amino- säuren	AE -- (Abb.1) ^a	AE (TSA- Hydr.) ^b	CM rech. DEAE-S. (Abb.6) ^c	Reste ganz- zählig	Summe der Peptide
Asp	17,64	18,18	17,20	17-18	18
Thr	11,51	11,65	11,86	12	12
Ser	9,72	9,60	9,73	10	10
Glu	15,15	15,47	14,78	15	15
Pro	12,00	12,28	11,79	12	12
Gly	14,70	15,31	14,79	15	15
Ala	7,77	8,09	7,89	8	8
Cys/2	4,27	5,51	6,95	7	7
Val	4,01	3,55	4,25	4	4
Met	3,32	3,59	3,69	4	4
Ile	8,34	7,88	8,15	8	9
Leu	14,51	14,01	13,74	14	15
Tyr	3,86	4,13	3,85	4	4
Phe	4,05	4,43	4,04	4	4
Lys	6,54	5,89	6,75	7	7
His	3,14	3,10	2,97	3	3
Arg	1,09	0,96	0,95	1	1
Trp		4,04		4	4
Glucos- amin	(2,12)	5,35			
Summe					152

^a Zwei-Säulen-System; saure und neutrale Aminosäuren Mittelwert aus drei, basische aus zwei Analysen;

^b Zwei-Säulen-System; 24-h-Toluolsulfonsäure-Hydrolyse;

^c carboxymethylierte B-Kette nach Rechromatographie an DEAE-Sephadex (Abb.7); Ein-Säulen-System; Ile und Leu aus Analyse im Zwei-Säulen-System;

10 Cysteinreste, die im Kallikrein nach Oxidation der Disulfidbrücken mit Perameisensäure aufgefunden worden waren. Die wesentlich geringere Ausbeute an Aminoäthylcystein gegenüber Carboxymethylcystein kennzeichnet alle vergleichbaren Analysen in unseren Untersuchungen. Da Greene et al. (52) nach enzymatischer Peptidhydrolyse eine ca. 15 % größere Ausbeute an Aminoäthylcystein als nach 24-h-HCl-Hydrolyse fanden, mag in Anbetracht auch der höheren Ausbeute an Aminoäthylcystein nach der Toluolsulfonsäurehydrolyse (Spalte 2 der Tab.9) an eine teilweise Zerstörung des Aminoäthylcysteins unter den Bedingungen der HCl-Hydrolyse gedacht werden. Da auch die Werte für Methionin nach der HCl-Hydrolyse aminoäthylierten Materials deutlich niedriger liegen als in carboxymethylierter B-Kette oder unmodifiziertem Kallikrein, könnte auch die Bildung eines Sulfoniumsalzes von Methionin und Aminoäthylcystein während der Aminoäthylierung (ca. 8facher Überschuß Äthylenimin), nicht jedoch bei der Carboxymethylierung (stöchiometrische Mengen Jodessigsäure zu SH-Gruppen) ein weiterer Grund für die niedrigen Ausbeuten sein (vgl. Kap.V). So fanden Schroeder et al. (53) nach 96h Inkubation eines Reduktionsansatzes der Apokatalase mit ca. 7-fachem Überschuß an Äthylenimin bei pH 8 einen 35 %igen Rückgang der Ausbeute an Aminoäthylcystein bei praktisch unverändertem Methioningehalt. Eine drastische Reduktion des Methioninwertes auf ca. 40 % der Ausgangsmenge erhielten diese Autoren nach der Inkubation des gleichen Reduktionsansatzes mit derselben Äthylenimin-

menge bei pH 2 für 48 h. Sie führten diese stark erniedrigten Ausbeuten in beiden Fällen auf die Bildung der Sulfoniumsalze der zwei Aminosäuren zurück, die sich bei der HCl-Hydrolyse jeweils zu mehreren Produkten zersetzen. Mit Bildung und Zersetzung eines solchen Sulfoniumsalzes dürfte zumindest der niedrige Methioningehalt derjenigen Proben zu erklären sein, die unmittelbar aus dem Reduktionsgemisch mit überschüssigem Äthylenimin entnommen und zur HCl-Hydrolyse eingesetzt wurden (Tab.15). Den gleichen Grund dürfte der niedrige Methioningehalt der B-Kette nach der Gelfiltration in 50 %iger Essigsäure haben (Tab.7), da der Spaltansatz, der ebenfalls überschüssiges Äthylenimin enthielt, vor der Gelfiltration mit dem gleichen Volumen Eisessig angesäuert wurde.

5. NebenkompONENTEN der Kettentrennung

Die Identifizierung der NebenkompONENTEN, wie sie in den Fraktionen C (AE) sowie C und D (CM) bei der Gelfiltration reduziert und alkylierten Kallikreins erhalten worden waren, konnte erst anhand der Ergebnisse der Sequenzanalyse durchgeführt werden. Die Rechromatographie des Gipfels C (CM) an SP-Sephadex (Abb.8) lieferte neben zwei kleineren Peaks einen Hauptgipfel, der ca. 40 % der aufgesetzten E_{280} (vgl. Kap.VI) enthielt. Seine Aminosäurezusammensetzung entsprach den 81 N-terminalen Resten der B-Kette, wie sie aus der Summe der Aminosäuren der beiden

Bromcyanpeptide B-CB-IV-1 und B-CB-I abzüglich des tryptischen Pentapeptids B-CB-I-T-III-2 (s.u.) ermittelt werden konnte (Tab.10). Zwischen der Aminosäurezusammensetzung der Fraktion C vor der Rechromatographie (Spalte 1 der Tab.10) und des Materials aus dem Hauptgipfel nach der Rechromatographie an SP-Sephadex konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Die Zuordnung dieses Peptids als aminoendständiges großes Bruchstück der B-Kette wurde durch die Identität seiner N-terminalen Sequenz Ala-Asp-Gly-Lys-Asp mit derjenigen der B-Kette bestätigt (vgl.Schema 2).

Das entsprechende C-terminale Bruchstück der B-Kette fand sich nach Rechromatographie der Fraktion D (CM) an SP-Sephadex unter ähnlichen Bedingungen (Abb.9). Die Aminosäurezusammensetzung der Peptide D-1 und D-2, in denen je ca. 40 % bzw. 15 % der aufgesetzten E_{280} erhalten worden waren, deckte sich mit derjenigen eines Fragmentes der B-Kette beginnend mit Pos. (83) bzw. (82) und endend mit dem C-Terminus der B-Kette. Außer durch Differenzbildung aus B-Kette und C-Peptid konnte der Aminosäuregehalt dieses Teils der B-Kette unabhängig aus der Summe der Aminosäurereste der Peptide B-CB-II, B-CB-IV-2, B-CB-IV-3 und B-CB-I-T-III-2 errechnet werden, die diesen C-terminalen Teil der B-Kette bilden mußten (s. Kap.V). Mit Lys-Val-Thr als aminoendständiger Sequenz erwies sich das in ca. 30 % der Ausbeute von D-1 anfallende Peptid D-2 als um N-terminal um einen Lysinrest verlängertes D-1-Material. Die Isolierung des schon mehrfach erwähnten tryptischen Peptids B-CB-I-T-III-2 hatte bereits auf das Vorhandensein eines Lysinrestes in der Position (82) der B-Kette schließen lassen.

Tab.10 Aminosäurezusammensetzung der Fraktion C (CM) vor (Spalte 1) und nach Rechromatographie (Spalte 2) an SP-Sephadex (Reste pro Molekül; Ein-Säulen-System)

	1	2	3	4
Amino- säuren	Fr.C (Abb.3)	Hauptpeak (Abb.8)	Reste gerundet	B-Kette Pos.(1)-(81)
Asp	9,39	8,89	9	10
Thr	4,75	4,95	5	5
Ser	4,90	5,10	5	5
Glu	11,40	10,99	11	12
Pro	6,38	6,98	7	7
Gly	5,40	5,24	5	5
Ala	5,73	5,77	6	6
CM-Cys	3,04	2,92	3	3
Val	3,29	3,09	3	3
Met	0,88	0,98	1	1
Ile	3,01	2,92	3	3
Leu	9,34	8,78	9	10
Tyr	1,27	1,07	1	1
Phe	3,42	3,07	3	3
Lys	2,88	3,09	3	3
His	1,91	1,85	2	2
Arg	1,05	1,03	1	1
Trp	1,20 ^a		1	1

^a aus 24-h-Toluolsulfonsäure-Hydrolyse

Mehrere Befunde ließen auf das Vorkommen monomerer A-Kette neben den beiden B-Ketten Bruchstücken in den Fraktionen C (AE) sowie C und D (CM) schließen. Nach dem negativen Ausgang der Rechromatographieveruche mit carboxymethylierter A-Kette konnte es

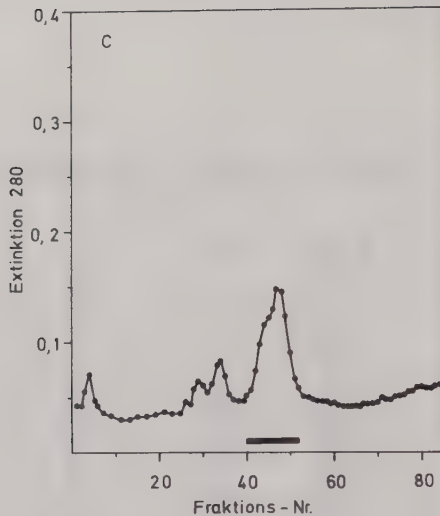


Abb.8 Rechromatographie von Material der Fraktion C (CM) (Abb.3) an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,9 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,5 M TEA in HAc 50 %, 0,05 M TEA.
Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 500 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 17 ml/h und die Fraktionsgröße 4,0 ml.
Es wurde Material, isoliert aus insgesamt 200,0 mg Kallikrein eingesetzt.

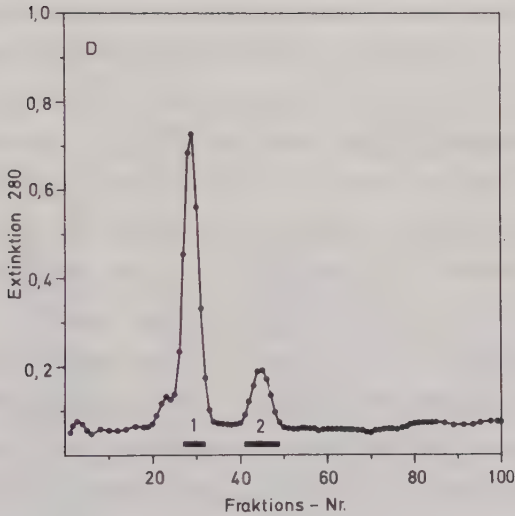


Abb.9 Rechromatographie von Material der Fraktion D (CM) (Abb.3) an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,9 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,6 M TEA in HAc 50 %, 0,05 M TEA.

Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 600 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 16 ml/h und die Fraktionsgröße 3,7 ml.

Material, isoliert aus insgesamt 200,0 mg Kallikrein wurde eingesetzt.

nicht überraschen, daß unter den Chromatographiebedingungen der Fraktionen C und D (Abb.8 und 9) keine A-Kette eluiert worden war. Wegen der vergleichbaren Größe aller drei Bestandteile bot die SDS-Elektrophorese kaum eine Unterscheidungsmöglichkeit (Abb.2 und 4). Bei der Disk-Elektrophorese (Abb.5) zeigten die Hauptkomponenten der Fraktionen C und D (CM) eine elektrophoretische Beweglichkeit, wie sie weder Material der A- noch der B-Kette aufwies. Zusätzlich zur Hauptbande enthält jedoch vor allem Material des D-Gipfels eine Zone, deren Beweglichkeit auf Identität mit der A-Kette schließen läßt.

Neben den Aminoendgruppen Ala bzw. Val, die von den beiden Bruchstücken der B-Kette herrührten, wurde bei der Bestimmung der N-Termini der Fraktion C (AE) mit der Dansylmethode auch Ile zusammen mit dem vermutlichen Dipeptid Ile-Ile gefunden und daraus der Schluß auf ein Vorkommen monomerer A-Kette auch in diesem Material gezogen.

Die quantitative Bestimmung der Carboxylendgruppen ermöglichte eine Abschätzung des Gehaltes von monomerer A-Kette und den beiden B-Ketten-Fragmenten in der Fraktion C (AE) (Tab.12). Auf Grund der bisherigen Argumentation kann der Gehalt an C-terminalem Leucin bzw. Serin der monomeren A-Kette zugerechnet werden. Er liegt zwischen 4 und 8 % der im Kallikrein als C-terminale Endgruppen bestimmten Menge an diesen beiden Aminosäuren. Zumindest teilweise muß die C-terminale Prolinendgruppe des carboxylendständigen Fragmentes der B-Kette den Prolingehalt

Tab.11 Aminosäurezusammensetzung der Fraktionen D-1 und D-2
(Abb.8)
(Reste pro Molekül; Ein-Säulen-System)

Amino- säuren		D-1		D-2		B-Kette Pos. (83)-(152)
		Reste gerundet		Reste gerundet		
Asp	7,40	7	7,31	7		8
Thr	6,60	7	6,33	6		7
Ser	5,01	5	4,88	5		5
Glu	3,16	3	3,31	3		3
Pro	5,04	5	4,91	5		5
Gly	9,78	10	9,61	10		10
Ala	2,01	2	2,13	2		2
CM-Cys	3,81	4	3,50	4		3
Val	1,00	1	1,07	1		1
Met	2,73	3	2,61	3		3
Ile						6
Leu						5
Tyr	2,91	3	2,76	3		3
Phe	1,03	1	1,09	1		1
Lys	2,89	3	3,42	3		3
His	0,88	1	0,97	1		1
Arg	0,05	0	0,04	0		0
Trp	3,01	3	2,73	3		3

der Tab.12 ausmachen. Ein Teil davon könnte jedoch auch von der Carboxylendgruppe des N-terminalen Bruchstückes herrühren, die bislang nicht eindeutig zu charakterisieren ist. Eine Aussage darüber wird erst die abgeschlossene Sequenz der B-Kette ermöglichen. Da die beiden Bruchstücke der B-Kette nach der Spaltung in gleichen Mengen vorhanden sein sollten, ergibt sich für den Gehalt des C-Peaks an B-Ketten-Fragmenten eine Obergrenze von 8 %.

Tab.12 Carboxylendgruppen von Kallikrein, A-Kette (AE), B-Kette (AE) und C-Peak (AE) in Mol pro Mol für die Trennung eingesetzten Kallikreins bzw. in % der in Kallikrein bestimmten Anzahl.

Amino- säuren	Kalli- krein	A-Peak (AE)		B-Peak (AE)		C-Peak (AE)	
		%		%		%	
Asp	0,03	0,01	33	0,03	100	0,007	23
Thr	0,03			0,01	33	0,004	13
Ser	0,24	0,17	71	0,05	21	0,018	8
Pro	0,71			0,52	73	0,058	8
Gly	0,06	0,03	50	0,05	83	0,015	25
Ala	0,08	0,08	100	0,02	25	0,037	46
Val	0,02						
Ile	0,02						
Leu	0,34	0,36	106			0,014	4

Wie die folgende Überlegung zeigt, läßt sich ein etwa gleiches Verhältnis von B-Ketten-Fragmenten zu monomerer A-Kette auch in den Fraktionen C und D nach der Auftrennung reduzierten und carboxymethylierten Kallikreins nachweisen. In der 1.Spalte der Tab. 13 ist die Aminosäurezusammensetzung der Fraktion D (CM) aufgeführt. Da das darin vorhandene carboxylendständige B-Ketten-

Tab.13 Zusammensetzung Peak D (CM) nach Reduktion und Carboxymethylierung von 94,4 mg Kallikrein (Abb.3)
(Alle Analysen im Ein-Säulen-System außer b)

Aminosäuren	D-Peak μMol ^a	D-Peak minus 0,23 μMol A-Kette μMol	D-1/D-2 0,49 μMol Reste	B-Kette Pos. (83)-(152)
Asp	5,82	3,54	7,22	8
Thr	3,79	3,12	6,37	7
Ser	3,08	2,17	4,43	5
Glu	3,42	1,59	3,24	3
Pro	3,19	2,27	4,63	5
Gly	6,09	4,50	9,18	10
Ala	2,19	1,05	2,14	2
CM-Cys	2,48	1,81	3,69	3
Val	2,03	0,66	1,35	1
Met	1,20	1,20	2,45	3
Ile				6
Leu				5
Tyr	2,08	1,39	2,84	3
Phe	1,94	0,57	1,16	1
Lys	2,19	1,50	3,06	3
His	1,67	0,53	1,08	1
Arg	0,46			
Trp	2,01 ^b	1,34 ^b	2,73	3
Glucos-amin	3,09 ^b	2,28 ^b	4,65	4,32

^a Mittel aus zwei Analysen;

^b 24-h-Toluolsulfonsäure-Hydrolyse; kurze Säule Zwei-Säulen-System;

Fragment keinen Argininrest enthält, dürfte der Wert von 0,46 μMol Arginin auf die Gegenwart von 0,23 μMol A-Kette zurückzuführen sein. Nach Abzug der 0,23 μMol A-Kette entsprechenden Menge an Aminosäuren von den Werten der 1. Spalte ergeben sich 0,49 μMol Material einer Zusammensetzung, die gut mit D-1/D-2 übereinstimmt (Spalten 2 und 3 der Tab.13): Mit 0,49 μMol B-Ketten-Fragmenten zu 0,23 μMol monomerer A-Kette errechnet sich somit das Verhältnis von beiden zu etwa 2:1.

Weiter konnte durch quantitative Aminosäureanalyse gezeigt werden, daß bei der Aufarbeitung von 94,4 mg Kallikrein (entsprechend der Abb.3) in der Fraktion C 0,51 μMol des N-terminalen Bruchstückes enthalten waren. Da aus der gleichen Menge Kallikrein 0,49 μMol an C-terminalem Bruchstück in der Fraktion D ermittelt wurden, ergab sich somit, daß erwartungsgemäß beide Fragmente der B-Kette im Verhältnis 1:1 vorhanden sind.

6. Zusammenfassung

In den bisherigen Abschnitten des Kap.III wurde dargelegt, daß sich Kallikrein nach reduktiver Spaltung der Disulfidbrücken in zwei Polypeptidketten auftrennen läßt. Zusätzlich wurden zwei Bruchstücke der größeren der beiden Ketten aufgefunden, die durch eine Spaltung im mittleren Bereich der B-Kette entstanden sein mußten.

Als Summe des Aminosäuregehaltes von A- und B-Kette ergeben

sich 231,5 Reste, die weitgehend der Anzahl von 229 Aminosäure-resten entsprechen, die bei der Bestimmung der Zusammensetzung des Kallikreins errechnet worden waren (Tab.14). Der Gehalt von 18 Asparagin(säure)resten in der B-Kette wurde bereits diskutiert (s.o.). Die Analysen hatten 17,5 Reste dieser Aminosäure(n) in der B-Kette ergeben, sodaß die 27 im Kallikrein bestimmten Asparagin(säure)reste in Anbetracht ihrer großen Anzahl in guter Übereinstimmung mit den 27,5 in beiden Ketten ermittelten Asparagin(säure)resten stehen. Für Threonin und Serin waren bei der Festlegung der Aminosäurezusammensetzung des Kallikreins jeweils 14,5 bzw. 13,5 Reste errechnet worden und die Angabe von 14 Resten in beiden Fällen durch Aufrundung des Seringehaltes und kompensatorische Abrundung des Threoninwertes erfolgt. Da der Gehalt von 13,5 Serinresten im Kallikreinmolekül infolge der teilweisen Abspaltung des C-terminalen Serins der A-Kette der Realität entspricht, entfällt die Kompensation durch Abrundung des Threoninwertes. Der Gehalt des Kallikreins an Threonin kann demzufolge ebensogut mit 15 Resten angegeben werden, was der Summe des Threoningehaltes beider Ketten entspricht.

Die Tatsache, daß die Summen sämtlicher Aminosäuren der Ketten und des Kallikreins - selbst bei Resten, die mehr als zwanzigmal vertreten sind wie Glu oder Gly - vollständig übereinstimmen, zeigt sehr deutlich, daß Kallikrein tatsächlich aus den aufgefundenen 79,5 Resten der A-Kette sowie den 152 Resten der

Tab.14 Aminosäurezusammensetzung der A- und der B-Kette
(nach Tab.8 und 9) sowie des Kallikreins (nach
Tab.3)

Amino- säuren	A-Kette	B-Kette	Summe der A- und B- Ketten	Kallikrein
Asp	10	18	28	27
Thr	3	12	15	14
Ser	3,5	10	13,5	14
Glu	8	15	23	23
Pro	4	12	16	16
Gly	7	15	22	22
Ala	5	8	13	13
Cys/2	3	7	10	10
Val	6	4	10	10
Met	0	4	4	4
Ile	3	9	12	12
Leu	5	15	20	19
Tyr	3	4	7	7
Phe	6	4	10	10
Lys	3	7	10	10
His	5	3	8	8
Arg	2	1	3	3
Trp	3	4	7	7
Glucos- amin	4,10	5,35	9,45	9,05
Summe	79,5	152	231,5	229

B-Kette besteht und bei der Isolierung der Fragmente nach Reduktion und Alkylierung keine weiteren Bruchstücke übersehen wurden.

Die Menge des Glucosamins, die in A- und B-Kette zusammen bestimmt wurde, entsprach mit 9,45 Resten ebenfalls etwa den 9,05 Resten Glucosamin, die in derjenigen Kallikreincharge nachge-

wiesen worden waren, mit der nahezu alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ausgeführt wurden (18). Die Verteilung der Glucosaminreste auf A- und B-Kette in etwa dem gleichen Ausmaß fand ihre Bestätigung durch gaschromatographische Analysen in unserem Arbeitskreis, die auf eine weitgehend gleichmäßige Verteilung aller Zuckerreste des Kallikreins auf beide Ketten schließen lassen.

Um die Gesamtausbeute jeder einzelnen Aminosäure nach der Auftrennung reduzierten aminoäthylierten Kallikreins durch Gel-filtration ermitteln zu können, wurden quantitative Aminosäureanalysen des auf die Säule aufgebrachten, sowie des in den drei Fraktionen A, B und C (Abb.1) eluierten Materials durchgeführt (Tab.15). Die Summe aller Aminosäuren in Peak A, B und C betrug im Mittel 94 % der aufgesetzten Menge. In den Fraktionen 73 - 120 konnten keine nennenswerten Mengen an Aminosäuren nachgewiesen werden. Mit 0,77 μ Mol A-Kette und 0,67 μ Mol B-Kette belief sich die Ausbeute gegenüber 0,89 μ Mol auf die Säule aufgebrachtem reduziertem und aminoäthyliertem Kallikrein auf 87 % bzw. 75 %.

Wie bereits erläutert, besteht das Material der Fraktion C (AE) in vergleichbaren Mengen aus zwei Bruchstücken der B-Kette und aus monomerer A-Kette. Da die A-Kette kein Methionin enthält, läßt sich aus dem Wert von 0,64 μ Mol dieser Aminosäure in der Fraktion C (nach Tab.15) auf einen Gehalt von ca. 0,16 μ Mol B-Ketten-Fragmenten und demzufolge von ca. 0,08 - 0,16 μ Mol (s.

Tab.15 Ausbeuten einzelner Aminosäuren nach Reduktion und Aminoäthyllierung des Kallikreins in den Fraktionen A, B und C der Gelfiltration (Abb.1)
(Alle Analysen Zwei-Säulen-System)

Amino- säuren	Kallikrein aufgesetzt ^a		A-Peak ^b		B-Peak ^a		C-Peak ^b		Summe A+B+C in g d. aufg.
	µMol	Reste	µMol	Reste	µMol	Reste	µMol	% aufg.	
Asp	24,40	27,38	7,70	9,96	11,89	17,64	4,05	16,6	97
Thr	13,08	14,68	2,54	3,29	7,76	11,51	2,37	18,1	97
Ser	11,92	13,38	2,96	3,83	6,55	9,72	2,13	17,9	98
Glu	20,25	22,72	6,30	8,15	10,21	15,15	3,55	17,5	99
Pro	12,61	14,15	3,09	4,00	8,09	12,00	2,42	19,2	108
Gly	19,62	22,02	5,61	7,26	9,91	14,70	3,42	17,4	97
Ala	11,41	12,81	3,87	5,01	5,24	7,77	1,92	16,8	97
AE-Cys	7,16	8,04	1,56	2,02	2,88	4,27	0,97	13,5	75
Val	8,67	9,73	4,34	5,61	2,70	4,01	1,29	14,9	96
Met	1,02	1,14	0,16	0,21	2,24	3,32	0,64		
Ile	9,40	10,54	1,79	2,35	5,62	8,34	1,76	18,7	98
Leu	17,89	20,08	4,00	5,17	9,78	14,51	3,15	17,6	95
Tyr	6,93	7,77	2,19	2,83	2,60	3,86	1,00	14,4	84
Phe	9,02	10,12	4,34	5,61	2,73	4,05	1,34	14,9	93
Lys	8,90	9,99	2,34	3,03	4,41	6,54	1,39	15,6	92
Hls	7,81	8,77	3,73	4,83	2,12	3,14	0,98	12,5	87
Arg			1,66	2,15	0,74	1,09	0,41		

saure und neutrale Aminosäuren jeweils: ^a Mittelwert aus drei Analysen
^b Mittelwert aus zwei Analysen
(basische Aminosäuren aus zwei
Analysen gemittelt)

Absatz 5) monomerer A-Kette schließen. Addiert man beides zu den entsprechenden Ketten, so ergibt sich mit einem Mittelwert von $0,89 \mu\text{Mol}$ A-Kette und $0,83 \mu\text{Mol}$ (teilweise gespalte-
ner) B-Kette, daß beide Ketten etwa im Verhältnis 1:1 erhalten wurden.

IV. A-Kette

1. Trypsinspaltung aminoäthylierter und maleylierter A-Kette

Die beiden Argininreste der A-Kette boten nach Blockierung der Aminogruppen von Lysin und Aminoäthylcystein günstige Angriffspunkte für eine tryptische Spaltung. Die erwarteten drei Peptide sollten allein durch Endgruppen- und Aminosäureanalysen in die Kette einzuordnen sein.

Somit wurde aminoäthylierte A-Kette nach Maleylierung mit Trypsin am Autotitrator gespalten. Der NaOH-Verbrauch ließ mit $0,8$ Äquivalenten in Relation zur eingesetzten Menge A-Kette erwarten, daß keine vollständige Spaltung beider Arginylbindungen erreicht worden war. Nach der Deacylierung wurde das tryptische Spaltgemisch durch Gelfiltration über Sephadex G-75 in 50 %

Essigsäure in zwei Peptide aufgetrennt, die entsprechend der Reihenfolge ihrer Elution mit A(AE,mal)-T-I und A(AE,mal)-T-II bezeichnet wurden (Abb.10). Der erste Gipfel um Fraktion 40 dürfte Reste ungespaltener B-Kette, der Gipfel um Fraktion 100 Salz enthalten.

Um das Peptid A(AE,mal)-T-II weiter zu reinigen, versuchten wir, eine Rechromatographie an SP-Sephadex C-25 in 0,05 M Ammoniumformiat bei pH 4 durchzuführen. Das Material passierte jedoch unretardiert die Säule. Die Aminosäurezusammensetzung des kleineren Peptids wurde erst nach diesem Rechromatographieversuch bestimmt. Der Aminosäuregehalt beider tryptischer Fragmente (Tab.16) umfasste mit 53 Resten im Peptid A(AE,mal)-T-I und 27 Resten in A(AE,mal)-T-II alle 80 Aminosäurereste der A-Kette. Das Extinktionsverhältnis der Fraktionen I und II bei 280 nm ließ darauf schließen, daß das Peptid A(AE,mal)-T-I alle drei Tryptophanreste der A-Kette enthielt.

Die Ausbeute an A(AE,mal)-T-I betrug mit 0,84 μ Mol (E_{280}) ca. 55 % der eingesetzten Menge von 1,47 μ Mol A-Kette. Trotz der stark schwankenden Ausbeuten an Glucosamin nach der 24-h-HCl-Hydrolyse legte das Auftreten von mehr als zwei Resten Glucosamin in A(AE,mal)-T-II gegenüber dem geringeren Glucosamingehalt von A(AE,mal)-T-I die Vermutung nahe, daß der gesamte Polysaccharidanteil der A-Kette an das 27-Reste-Peptid gebunden vorliegt. Dies erleichterte die weitere Untersuchung des 53-Reste-Peptides und seiner Spaltprodukte, da nicht mit Störun-

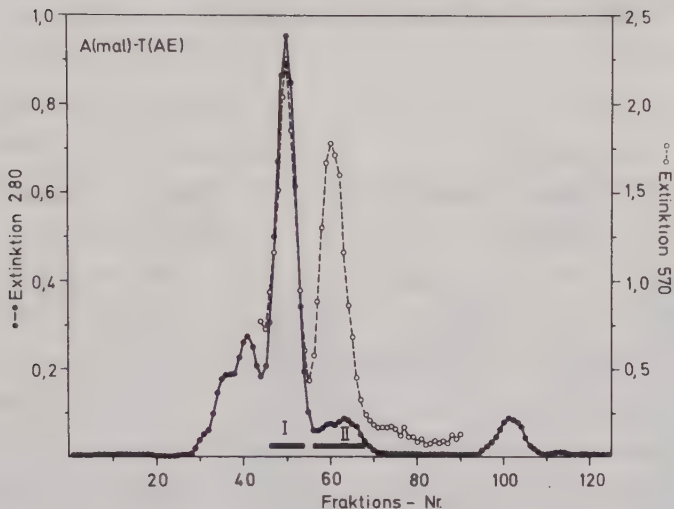


Abb.10 Gelfiltration des Ansatzes nach der tryptischen Spaltung aminoäthylierter maleylierter A-Kette ($1,47 \mu\text{Mol}$) an Sephadex G-75 in 50 % Essigsäure. Die Säule ($100 \times 2 \text{ cm}$) wurde mit ca. 12 ml/h eluiert und Fraktionen von $3,0 \text{ ml}$ gesammelt. $1,0 \text{ ml}$ davon wurden für die Ninhydrinreaktion eingesetzt.

gen der Aminosäureanalyse durch Glucosamin im einfacher zu handhabenden Ein-Säulen-System zu rechnen war (vgl. Kap.VI).

Der Gehalt von zwei Argininresten in A(AE,mal)-T-I und das vollständige Fehlen dieser Aminosäure in A(AE,mal)-T-II zeigte, daß das 53-Reste-Peptid den N-Terminus und das 27-Reste-Peptid den

Tab.16 Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide
aminoäthylierter, maleylierter A-Kette
(Zwei-Säulen-System; Reste pro Molekül)

Amino- säuren	A(AE,mal)-T-I			A(AE,mal)-T-II		
		Reste ganz- zahlig	Sequenz		Reste ganz- zahlig	Sequenz
Asp	5,33	5	5(4Asn)	5,02	5	5(4Asn)
Thr	1,25	1	1	2,04	2	2
Ser	3,21	3	3	0,41	ca.0,5	1
Glu	5,26	5	5(2Gln)	2,96	3	3
Pro	2,08	2	2	1,99	2	2
Gly	5,11	5	5	2,03	2	2
Ala	2,98	3	3	1,97	2	2
AE-Cys	2,34	3	3	0,01	0	0
Val	4,94	5	5	1,03	1	1
Met	<0,01	0	0	<0,01	0	0
Ile	2,74 ^a	3	3	<0,01	0	0
Leu	2,97	3	3	1,81	2	2
Tyr	2,92	3	3	0,01	0	0
Phe	1,16	1	1	5,02	5	5
Lys	2,78	3	3	0,02	0	0
His	2,71	3	3	1,74	2	2
Arg	1,89	2	2	<0,01	0	0
Trp		(3)	3	(0)	0	0
Glucos- amin	(0,13)			(2,05)		
Summe		53	53		26,5	27

^a 120-h-Hydrolyse

C-Terminus der A-Kette bildet. Da das C-terminale Serin der A-Kette teilweise abgebaut ist (vgl. Kap.III), kann daraus auch der halbe Serinrest erklärt werden, der bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des 27-Reste-Peptides aufgefunden wurde.

Wie es das Resultat dieser arginingerichteten tryptischen Spaltung erwarten ließ, fand sich bei der Sequenzanalyse der A-Kette in der Position (53) ein Argininrest. Das zweite Arginin der A-Kette wurde in der Position (5) aufgefunden. Der Grund dafür, daß unter den gegebenen Bedingungen vornehmlich die Bindung Arg(53)-His(54), kaum jedoch Arg(5)-Glu(6) angegriffen wurde, könnte in der Anhäufung von vier negativen Ladungen entsprechend der Sequenz Arg(5)-Glu(6)-Cys(AE,mal)(7)-Glu(8)-Lys(mal)(9)- in unmittelbarer Folge auf die Arginylbindung liegen.

Da das aminoendständige 53-Reste-Peptid sämtliche Lysin- sowie Aminoäthylcysteinreste und somit alle weiteren tryptischen Spaltstellen der A-Kette umfaßte, war das Ziel, durch arginingerichtete Spaltung für einen weiteren tryptischen Abbau besser geeignete Peptide zu erhalten, nicht erreicht worden. Mit acht Angriffspunkten für Trypsin ließ die aminoäthylierte Modifikation der A-Kette ein möglicherweise schwierig aufzutrennendes Gemisch von Peptiden nach vollständiger tryptischer Hydrolyse erwarten. Deshalb wurden die folgenden Untersuchungen zur Struktur der A-Kette an carboxymethyliertem Material durchgeführt, das drei potentielle tryptische Spaltstellen weniger enthält.

2. Trypsinspaltung carboxymethylierter A-Kette

Die tryptische Hydrolyse carboxymethylierter A-Kette wurde unter sonst vergleichbaren Bedingungen mit einer fünffach größeren Enzymmenge als diejenige aminoäthylierten, maleylierten Materials durchgeführt, um eine möglichst vollständige Spaltung aller Arginyl- und Lysylbindungen zu erreichen. Es wurden 13,4 mg carboxymethylierter A-Kette zur Spaltung eingesetzt. Dies entsprach 1,09 μMol A-Kette, da der Aminosäureanalyse zufolge 18,5 mg eines unter gleichen Bedingungen isolierten Materials 1,50 μMol carboxymethylierter A-Kette enthielten. Nach ca. 2 h NaOH-Aufnahme am Autotitrator kam die Reaktion zum Stillstand. Trypsin wurde durch die Zugabe von SBI inaktiviert. Die Lösung wurde im Stickstoffstrom auf 0,5 ml eingeeengt und 0,5 g Guanidiniumchlorid zugesetzt. Die Auftrennung des Gemisches erfolgte durch Gelfiltration über Sephadex G-50. Um die verhältnismäßig aufwendige Ninhydrindetektion zu vermeiden, wurde als Elutionsmittel 0,1 M NH_4HCO_3 , pH 8 gewählt, das die Messung der Extinktion auch bei 220 nm erlaubte. Das Elutionsdiagramm wies nach der Extinktionsmessung bei 280 nm sechs, bei 220 nm sieben Gipfel auf (Abb.11). Bei der weiteren Reinigung bzw. Auftrennung der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Bruchstücke durch Ionenaustauschchromatographie konnten im Folgenden alle für eine vollständige Sequenzierung der A-Kette nötigen Peptide isoliert und zugeordnet werden.

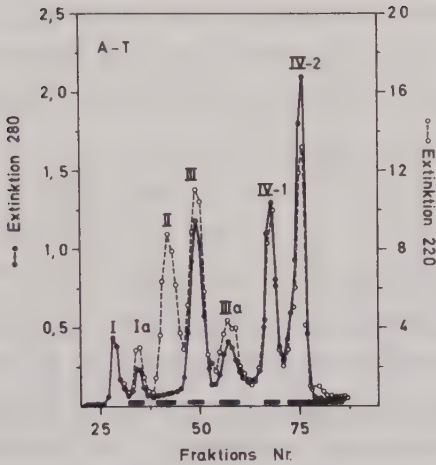


Abb.11 Auftrennung der tryptischen Peptide carboxymethylierter A-Kette (1,09 μ Mol) durch Gelfiltration über Sephadex G-50
Die Säule (140 x 0,9 cm) war mit 0,1 M NH_4HCO_3 , pH 8 äquilibriert und wurde mit ca. 6 ml/h betrieben. Fraktionen mit 1,1 ml wurden gesammelt.

Fraktionen A-T-I und A-T-Ia

Das Material des Gipfels I, der ca. 6 % der insgesamt eluierten E_{280} enthielt, konnte bei der Chromatographie an SP-Sephadex (HAc 50 %; 0,05 M NaOH) mit einem NaCl-Gradienten bis 0,5 M nicht mehr von der Säule desorbiert werden.

Ähnliches Verhalten zeigte das mit ca. 3 % der gesamten E_{280} vorliegende Material des Gipfels Ia. Selbst bei Verwendung eines Konzentrationsgradienten bis 1,5 M NaCl unter sonst gleichen Chromatographiebedingungen und abschließender Elution der Säule mit 6 M Guanidiniumchlorid-Lösung konnte das auf die Säule aufgebrachte Material nicht mehr wiedergewonnen werden.

Da jedoch die aus den folgenden Fraktionen II bis IV-2 isolierten Peptide eine lückenlose Rekonstruktion der A-Kette ermöglichen und zumindest der Peak Ia durch seine verhältnismäßig geringe Extinktion bei 220 nm auf wenig Material schließen ließ, schien es nicht allzu bedenklich, auf eine weitere Charakterisierung von I und Ia zu verzichten. Dem Elutionsverhalten zufolge dürfte es sich wohl um Reste ungespaltener A-Kette sowie um Trypsin und SBI handeln.

Peptid A-T-II

Das nach der Spaltung aminoäthylierter, maleylierter A-Kette isolierte C-terminale 27-Reste-Peptid hatte weder Cystein noch tryptische Angriffsstellen wie Lysin oder Arginin enthalten. Demzu-

folge war zu erwarten, daß es in unveränderter Form auch bei der tryptischen Spaltung carboxymethylierter A-Kette anfallen würde. Bereits die fehlende Extinktion bei 280 nm in einem Gipfel mit verhältnismäßig hoher Extinktion bei 220 nm ließ dieses tyrosin- und tryptophanfreie Peptid in der Fraktion II vermuten. Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Gipfels II (Spalte 1 der Tab.17) bestätigte diese Annahme, wies jedoch zugleich auf eine nicht ausreichende Reinheit des Materials. Da jedoch das Fehlen weiterer tryptischer Spaltstellen eine vollständige Sequenzierung aller 27 Reste des Peptids A-T-II wünschenswert machte, war in diesem Fall größtmögliche Reinheit des Peptidmaterials von besonderer Bedeutung.

Nachdem A(AE,mal)-T-II an SP-Sephadex bei pH4 nicht retardiert worden war, wurde die Ionenaustauschchromatographie nun an DEAE-Sephadex A-25 durchgeführt. Damit ließ sich ein ninhydrin-positiver Gipfel eluieren (Abb.12).

Die Aminosäurezusammensetzung der wie eingezeichnet vereinigten Fraktionen (Spalte 2 der Tab.17) zeigte durch den Rückgang des Lysin-, Tyrosin- und Carboxymethylcysteingehaltes auf jeweils 1/5 bis 1/10 des ursprünglichen Wertes deutlich den Reinigungseffekt dieser Chromatographie. Mit 0,38 Resten Serin wies das Glykopeptid A-T-II ebenfalls jenen für den C-Terminus der A-Kette charakteristischen nicht ganzzahligen Serinwert auf. Die Ausbeute des Peptids A-T-II belief sich nach der Gelfiltration mit 0,96 μ Mol auf ca. 90 % der eingesetzten Menge von 1,09

Tab.17 Aminosäurezusammensetzung des Peptids A-T-II vor und nach Rechromatographie an DEAE-Sephadex A-25 (Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül)

	1	2	3	4
Amino- säuren	vor Rechrom.	nach Rechrom.	Reste ganz- zählig	Sequenz
Asp	4,90	4,85	5	5(4Asn)
Thr	1,99	2,05	2	2
Ser	0,69	0,38	ca.0,5	1
Glu	2,96	3,05	3	3
Pro	2,34	2,01	2	2
Gly	2,36	2,04	2	2
Ala	2,03	1,98	2	2
CM-Cys	0,09	0,02	0	0
Val	1,13	1,03	1	1
Met	<0,01	<0,01	0	0
Ile		0,02 ^a	0	0
Leu		1,84 ^a	2	2
Tyr	0,09	0,02	0	0
Phe	4,76	4,97	5	5
Lys	0,13	0,01	0	0
His	1,89	1,91	2	2
Arg	<0,01	<0,01	0	0
Trp	(0)		0	0
Glucos- amin		(1,56) ^a		
Summe			26,5	27

^a Zwei-Säulen-System

μMol A-Kette. Bei der Rechromatographie an DEAE-Sephadex wurde in den wie angegeben vereinigten Fraktionen von 1,60 μMol aufgesetztem Peptid (Material aus zwei Chargen) 1,12 μMol entsprechend ca. 70 % der eingesetzten Peptidmenge eluiert. Die Ge-

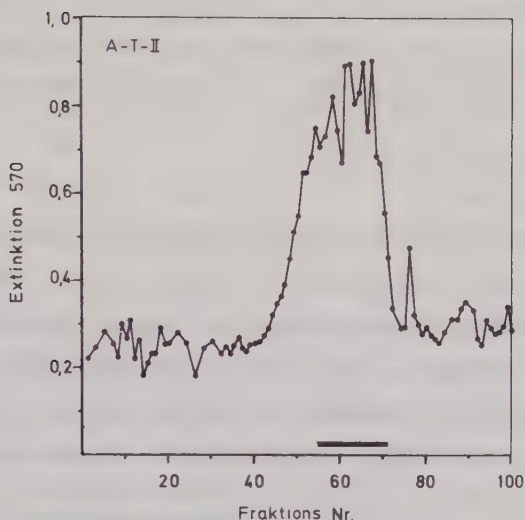


Abb.12 Rechromatographie von 1,60 μ Mol Material des Peptids A-T-II (Abb.11) an DEAE-Sephadex A-25 mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,02 - 0,05 M TEAA bei pH 4,5. Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 400 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 25 ml/h und die Fraktionsgröße 3,4 ml. Zur Ninhydrindetektion wurden 0,05 ml einer jeden Fraktion verwendet.

samtausbeute an reinem Peptid A-T-II betrug somit ca. 60 %.

Der hohe Reinheitsgrad des Materials, der bei der Rechromatographie erreicht worden war, ermöglichte die vollständige Sequenzierung aller 27 Aminosäurereste (s. Absatz 3; Schema 1).

Fraktion A-T-III

Die verhältnismäßig hohe Extinktion der Fraktion III bei 280 nm (Abb.11) ließ auf das Vorhandensein von Peptidmaterial mit mindestens einem der drei Tryptophanreste der A-Kette schließen. Der Gehalt von 0,34 Argininresten in der Aminosäurezusammensetzung dieses Materials (Spalte 1 der Tab.18) zeigte, daß es sich dabei nicht um ein bereits homogenes Peptid handeln konnte.

Die weitere Auftrennung durch Ionenaustauschchromatographie wurde zunächst an DEAE-Sephadex mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,1 bis 0,5 M TEAA bei pH 6 versucht. Jedoch konnten von der eingesetzten E_{280} nur ca. 5 % im Eluat aufgefunden werden. Die anschließende Elution dieser Säule mit einem Konzentrationsgradienten bis 2 M NaCl in 1,5 M TEAA, pH 6 erbrachte ebenfalls keine nennenswerten E_{280} mehr.

Ein weiterer Rechromatographieversuch von A-T-III an CM-Sephadex C-25 bei pH 6 in 0,02 M TEAA ergab, daß unter diesen Bedingungen das Material nicht retardiert wurde.

Von der Senkung des pH-Wertes auf 3 erwarteten wir eine Zurück-

drängung der Carboxylgruppendifsoziation und somit durch die Zunahme der positiven Nettoladung eine Adsorption des Peptidmaterials an SP-Sephadex. Zwar gelang es, durch die gewählten Bedingungen das Material A-T-III an SP-Sephadex zu binden, jedoch konnten durch einen Gradienten von 0,05 bis 0,7 M TEAF bei pH 3 nur ca. 10 % der eingesetzten E₂₈₀ eluiert werden. Selbst nach abschließender Elution der Säule mit 70 % Ameisensäure ließ sich die Hauptmenge des Materials nicht mehr wiedergewinnen.

Nachdem weiterhin auch die Rechromatographie von A-T-III an SP-Sephadex C-25 in 50 %iger Essigsäure, gepuffert mit 0,05 M TEA und einem TEA-Konzentrationsgradienten bis 0,25 M ein negatives Resultat ergeben hatte, brachte die Chromatographie im selben System, jedoch mit NaOH/NaCl anstelle von TEA die Elution eines Großteils der aufgesetzten E₂₈₀ bereits bei ziemlich geringer Salzkonzentration. Deshalb wurde bei der präparativen Wiederholung dieses Chromatographieversuches (Abb.13) zunächst ein flacher Konzentrationsgradient bis 0,1 M NaCl angelegt. Nach dessen Verbrauch, ohne daß das Material eluiert worden wäre, wurde ein weiterer Gradient von 0,1 bis 0,5 M NaCl angeschlossen. Ca. 45 % der eingesetzten E₂₈₀ wurden dabei in der ersten Fraktion (A-T-III-1), ca. 25 % in einer zweiten (A-T-III-2) und ca. 20 % in einer dritten Fraktion aufgefunden. Somit konnte ausschließlich in diesem System eine fast vollständige Wiedergewinnung des Materials bei der Ionenaustauschchromatographie erreicht werden.

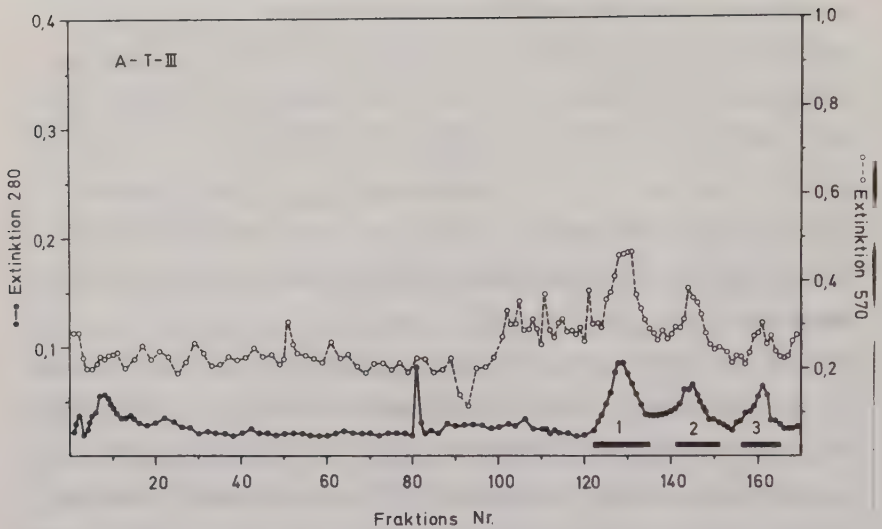


Abb.13 Chromatographie von Material der Fraktion A-T-III (Abb.11) an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,9 cm) in HAc 50 %, 0,05 M NaOH. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug ca. 15 ml/h, die Fraktionsgröße 3,5 ml. Zur Ninhydrindetektion wurden Proben von 0,5 ml/Fraktion entnommen. Bis Fraktion 106 wurde ein Gradient von 0 bis 0,1 M NaCl in obigem Elutionsmittel mit einem Gesamtvolumen von 400 ml angelegt. Ab Fraktion 107 wurde ein Gradient von 0,1 bis 0,5 M NaCl in HAc 50 %, 0,05 M NaOH, ebenfalls mit einem Gesamtvolumen von 400 ml, verwendet.

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von A-T-III-1 ergab ein Peptid mit 29 Aminosäuren (Spalten 2 bis 4 der Tab.18), diejenige von A-T-III-2 zunächst ein Peptid mit 33 Aminosäuren (Spalten 5 bis 7 der Tab.18). Nach den im folgenden dargelegten Überlegungen enthält A-T-III-2 jedoch als N-terminales Peptid der A-Kette die Sequenz Ile-Ile, die bei der 24-h-HCl-Hydrolyse nur unvollkommen gespalten wird, sodaß mit der Erhöhung des Isoleucingehaltes um einen Rest in diesem Peptid 34 Aminosäuren enthalten sind. Die Aminosäurezusammensetzung des dritten Gipfels ermöglichte keine eindeutige Interpretation (Spalte 8 der Tab.18).

Die Zusammensetzung von A-T-III-2 deckt sich bis auf je zwei zusätzliche Reste von Isoleucin und Glycin sowie einen zusätzlichen Argininrest mit derjenigen von A-T-III-1. Die Elutionsreihenfolge des 29-Reste- und des 34-Reste-Peptids entspricht dem Verhalten, das wir in dem verwendeten Chromatographiesystem erwarteten. Durch die in dem 34-Reste-Peptid zusätzlich enthaltene positive Ladung des Arginins wurde A-T-III-2 stärker an SP-Sephadex retardiert und somit gut von A-T-III-1 abgetrennt.

Nach der direkt an der A-Kette ermittelten Sequenz paßt die Zusammensetzung des 34-Reste-Peptids genau auf ein N-terminales Fragment von Ile(1) bis Lys(34). Das 29-Reste-Peptid stimmt mit der Zusammensetzung eines Bruchstückes überein, das durch die Abspaltung der N-terminalen Sequenz Ile-Ile-Gly-Gly-Arg aus dem

Tab.18

Aminosäurezusammensetzung des Materials A-T-III (Abb.11) sowie der Peptide A-T-III-1, A-T-III-2 und der Fraktion A-T-III-3 (Abb.13) (Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül)

Aminosäuren	1	2	3	4	5	6	7	8
	A-T-III	A-T-III-1	A-T-III-2	A-T-III-3	A-T-III-3	A-T-III-3	A-T-III-3	A-T-III-3
Asp	2,27	2,03	2	2Asn	2,15	2	2Asn	29,0
Thr	0,23	0,02	0	0	0,04	0	0	10,1
Ser	2,56	2,94	3	3	3,36	3	3	33,1
Glu	3,38	3,95	4	4(2Gln)	4,32	4	4(2Gln)	42,2
Pro	2,40	2,16	2	2	2,44	2	2	24,9
Gly	2,87	2,14	2	2	3,94	4	4	30,6
Ala	1,13	1,00	1	1	1,11	1	1	30,7
CM-Cys	1,55	1,93	2	2	1,88	2	2	24,9
Val	2,29	2,92	3	3	2,94	3	3	38,4
Met	0,02	0,02	0	0	0,02	0	0	<1
Ile	1,44	1,03	1	1	1,87	1	1	13,7
Leu	1,30	0,99	1	1	0,97	1	1	22,0
Tyr	1,57	1,98	2	2	1,92	2	2	20,1
Phe	1,32	1,06	1	1	1,07	1	1	8,9
Lys	1,68	1,92	2	2	1,86	2	2	26,2
His	1,77	1,89	2	2	1,86	2	2	23,4
Arg	0,34	0,02	0	0	0,85	1	1	2,9
Trp	(1)	0,83 ^a	1	1	(2,30) ^a	(1)	1	
Summe		29	29	29	34	34	34	

^a aus E280

34-Reste-Peptid entstanden ist und von Glu(6) bis Lys(34) reicht (s. Schema 1).

Der Gipfel III (Abb.11) enthielt ca. 0,6 μ Mol der Mischung beider Peptide, so daß die Ausbeute in Bezug auf die eingesetzte Menge von 1,09 μ Mol A-Kette durch Spaltung an Lys(34) etwa 55 % betrug. Weitere 10 % des Peptids A-T-III-1 wurden in der Fraktion A-T-IIIIa aufgefunden (s.u.), sodaß die Gesamtausbeute auf ca. 60 % zu erhöhen ist. Mit 0,34 Resten Arginin enthielt dieses Material einen Gehalt von etwa einem Drittel der Gesamtmenge an Peptid A-T-III-2.

Mit der Isolierung eines N-terminalen Peptids mit 34 Aminosäuren und eines C-terminalen Peptids mit 27 Aminosäuren blieb zur Vervollständigung der Sequenz der A-Kette nun noch die Charakterisierung geeigneter Peptide für die Positionen (35) bis (53).

Fraktion A-T-IIIIa

Die verhältnismäßig geringe Extinktion bei 220 nm ließ erwarten, daß der Gipfel A-T-IIIIa (Abb.11) keine Hauptbruchstücke der A-Kette enthalten würde. Die Aminosäurezusammensetzung deutete auf eine Mischung mehrerer Peptide hin (Spalte 1 der Tab.19). Bei der Rechromatographie an SP-Sephadex (50 % HAc, 0,05 M NaOH) mit einem NaCl-Gradienten wurde das Material aus A-T-IIIIa in drei ninhydrinpositive Peaks aufgetrennt, von denen zwei auch in der Extinktionsmessung bei 280 nm aufzufinden waren (Abb.14). Zur

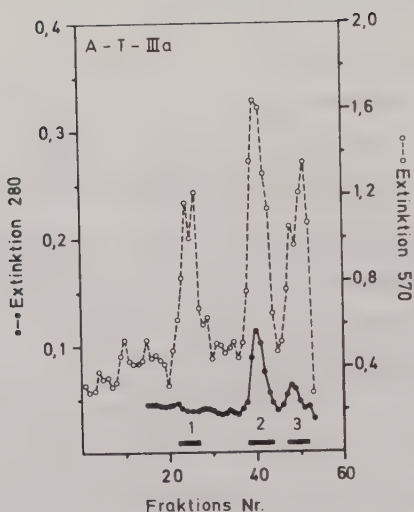


Abb.14 Chromatographie der Fraktion A-T-IIIa (Abb.11) an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,9 cm) in HAc 50%, 0,05 M NaCl Material aus zwei tryptischen Spaltansätzen mit insgesamt 2,67 μ Mol A-Kette wurde eingesetzt. Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 400 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 17 ml/h und die Fraktionsgröße 3,7 ml. Zur Ninhydrindetektion wurden Proben von 0,5 ml pro Fraktion entnommen.

Rechromatographie wurde Material aus zwei tryptischen Spaltansätzen mit insgesamt $2,67 \mu\text{Mol}$ A-Kette eingesetzt. Die im Folgenden angegebenen Ausbeuten sind der Übersichtlichkeit wegen auf $1,09 \mu\text{Mol}$ A-Kette entsprechend dem in Abb.11 dargestellten tryptischen Spaltansatz umgerechnet.

Der zweite der drei Gipfel (A-T-IIIa-2) erwies sich durch seine Aminosäurezusammensetzung als identisch mit dem 29-Reste-Peptid A-T-III-1 (Spalten 2 und 3 der Tab.19), obwohl für die Elution dieses Materials, deutlich abgetrennt von der Hauptmenge des Peptids, keine plausible Erklärung gefunden werden konnte. Die in A-T-IIIa-2 eluierte Menge des 29-Reste-Peptids betrug mit ca. $0,05 \mu\text{Mol}$ etwa 10 % der Hauptmenge dieses Peptids.

Der Aminosäuregehalt von A-T-IIIa-1 (Spalte 1 der Tab.20) ließ wiederum auf eine Mischung von Peptiden schließen. Erst die vollständige Sequenz der A-Kette ermöglichte eine Interpretation. Die fehlende Extinktion dieses Gipfels bei 280 nm sowie vor allem der hohe Phenylalaningehalt des Materials deuteten auf das Vorliegen des Peptids A-T-II, das 5 der 6 Phenylalaninreste der A-Kette enthält. Unter der Annahme, daß diese fünf Phenylalaninreste den Gehalt von A-T-IIIa-1 an dieser Aminosäure ausmachen, errechnet sich ein Wert von $14,4 \text{ nmol}$ A-T-II in der Fraktion A-T-IIIa-1. Nach Abzug der Aminosäuremenge, die $14,4 \text{ nmol}$ des Peptids A-T-II entsprechen, vom Aminosäuregehalt des Materials A-T-IIIa-1 (Spalte 2 der Tab.20) bleibt ein Peptid mit einer Aminosäurezusammen-

Tab.19 Aminosäurezusammensetzung von A-T-IIIa (Abb.11)
und A-T-IIIa-2 (Abb.14)
(Ein-Säulen-System)

	1	2	3	4
Amino- säuren	A-T-IIIa	A-T-IIIa-2		A-T-III-1
	μMol	Reste berechn.	Reste ganzz.	
Asp	1,01	2,18	2	2
Thr	0,24	0,08	0	0
Ser	0,83	2,90	3	3
Glu	1,54	3,69	4	4
Pro	0,58	1,81	2	2
Gly	1,13	1,98	2	2
Ala	0,43	1,05	1	1
CM-Cys	0,60	1,58	2	2
Val	0,92	2,67	3	3
Met	0,01	0,01	0	0
Ile	0,43	0,98	1	1
Leu	0,44	1,03	1	1
Tyr	0,46	1,85	2	2
Phe	0,56	1,03	1	1
Lys	0,62	2,27	2	2
His	0,57	1,87	2	2
Arg	0,19	0,01	0	0
Trp		1,07 ^a	1	1

^a aus E₂₈₀

Tab.20 Aminosäurezusammensetzung des Gipfels A-T-IIIa-1
(Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül)

	1	2	3	4	5
Amino- säuren	A-T-IIIa-1 nmol	A-T-IIIa-1 minus 14,4 nmol nmol	A-T-II Reste ber.	A-T-II Reste ganzz.	A-Kette Position (25)-(34)
Asp	108,4	36,3	0,87	1	1
Thr	42,4	13,6	0,33		
Ser	19,6	5,2	0,12		
Glu	91,5	48,3	1,16	1	1
Pro	48,1	19,3	0,46	0-1	1
Gly	108,4	79,5	1,91	2	2
Ala	26,9				
CM-Cys	39,6	39,6	0,95	1	1
Val	105,5	91,1	2,18	2	2
Met	< 1				
Ile	2,4	2,4	0,06		
Leu	57,8	29,0	0,70	1	1
Tyr	2,5	2,5	0,06		
Phe	72,1				
Lys	40,7	40,7	0,98	1	1
His	19,6				
Arg	< 1				
Summe				9-10	10

setzung, die den Positionen (25) bis (34) der A-Kette entspricht (Spalten 3 bis 5 der Tab.20). Den C-Terminus dieses Peptides bildet Lys (34); der N-Terminus dürfte bei der Spaltung der Bindung Phe(24)-Gln(25) durch Reste von chymotrypsinähnlicher Aktivität des Trypsins freigesetzt worden sein. Die Menge dieses Peptids A-T-IIIA-1 entsprach mit etwa 35 nmol einer 3 %igen Ausbeute.

Ein ähnliches Subtraktionsverfahren führte zu einer Interpretation des Peptidgemisches in der Fraktion A-T-IIIA-3. Die Aminosäurezusammensetzung dieses Gipfels (Spalte 1 der Tab.21) zeigte vergleichbare Mengen Asp, Ser, Pro, Ala, Val, Tyr und His. Deshalb wurde eine Sequenz der A-Kette aufgesucht, die all diese Reste enthielt und zugleich als tryptisches oder chymotryptisches Peptid in Frage kam. Sie fand sich in Asn(10) bis Tyr(19) (vgl. Schema 1). Nach Subtraktion von 25,7 nmol dieses 10-Reste-Peptids (A-T-IIIA-3a) vom Aminosäuregehalt des Peaks A-T-IIIA-3 blieb ein Peptid (A-T-IIIA-3b) mit einer Aminosäurezusammensetzung, die eindeutig auf die Positionen Ile(1) bis Lys(9) paßte (Spalten 2 bis 4 der Tab.21; vgl. Schema 1).

Nach der Gegenprobe, der Subtraktion von 89,5 nmol des N-terminalen 9-Reste-Peptids A-T-IIIA-3b vom gesamten Aminosäuregehalt des Peaks A-T-IIIA, blieb ein Peptid mit einer Aminosäurezusammensetzung, die ausnahmslos derjenigen von A-T-IIIA-3a entsprach (Spalten 5 bis 7 der Tab.21; vgl. ebenfalls Schema 1). Die Ausbeuten des Peptids A-T-IIIA-3a, dessen C-Terminus offensichtlich

Tab.21 Aminosäurezusammensetzung des Gipfels A-T-IIIa-3
(Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül)

Aminosäuren	1	2	3	4	5	6	7
	A-T-IIIa-3	A-T-IIIa-3 minus 25,7 nmol A-T-IIIa-3a nmol	A-T-IIIa-3b Reste ber.	A-T-IIIa-3b Reste ganzz.	A-T-IIIa-3 minus 89,5 nmol A-T-IIIa-3b nmol	A-T-IIIa-3a Reste ber.	A-T-IIIa-3a Reste ganzz.
Asp	29,4	3,6	0,04		29,4	1,14	1
Thr	3,3	3,3	0,04		3,3	0,13	1
Ser	33,2	7,4	0,08		33,2	1,29	1
Glu	206,3	180,6	2,02	2	27,3	1,06	1
Pro	21,9				21,7	0,85	1
Gly	179,8	179,3	2,01	2	0,8	0,03	1
Ala	27,4	1,6	0,02		27,4	1,06	1
CM-Cys	85,3	85,3	0,95	1			
Val	25,7	<1			25,7	1,00	1
Met	<1						
Ile	116,1	90,4	1,01	2		1,04	1
Leu	4,6	4,5	0,05		26,6	0,18	1
Tyr	24,5				4,1	0,95	1
Phe	4,0	4,0	0,04		24,3	0,16	
Lys	94,2	94,2	1,05	1	4,0	0,18	1
His	25,3				4,6	0,98	
Arg	88,7	88,7	0,99	1	25,3		
Trp						1,03a	1
Summe				9			10

a aus E280

durch chymotrypsinähnliche Aktivität freigesetzt wurde, betrug mit ca. 25 nmol etwa 2 % bezogen auf 1,09 μ Mol A-Kette. Mit rund 0,09 μ Mol entsprechend etwa einer 8 %igen Ausbeute an Peptid A-T-IIIa-3b zeigte sich, daß die Bindung Lys(9)-Asn(10) bei der tryptischen Spaltung nur wenig angegriffen worden war. Der Grund dafür könnte in der Anhäufung von drei negativen Ladungen entsprechend der Sequenz Glu(6)-Cys(CM)(7)-Glu(8)-Lys(9)- unmittelbar vor der tryptischen Angriffsstelle liegen.

Im Gipfel IIIa (Abb.11) konnten somit insgesamt fünf verschiedene Bestandteile identifiziert werden. Es handelte sich um Material der bereits vorher isolierten Peptide A-T-II und A-T-III-1, sowie weiterhin um geringe Mengen des tryptischen Peptids A-T-IIIa-3b Ile(1) bis Lys(9) und der beiden durch chymotrypsinähnliche Aktivität entstandenen Fragmente A-T-IIIa-1 Glu(25) bis Lys(34) und A-T-IIIa-3a Asn(10) bis Tyr(19) .

Fraktion A-T-IV-1

Der hohen Extinktion bei 280 nm zufolge erwarteten wir in der Fraktion A-T-IV-1 (Abb.11) ebenfalls Peptidmaterial mit einem der drei Tryptophanreste der A-Kette. Die Aminosäurezusammensetzung dieses Gipfels (Spalte 1 der Tab.22) wies wiederum auf ein Gemisch von Peptiden hin.

Zunächst versuchten wir dessen Auftrennung durch Chromatographie an DEAE-Sephadex bei pH 6,0 mit einem TEA-Konzentrationsgradien-

ten von 0,1 bis 1,5 M zu erreichen. Dabei wurde das Material nicht retardiert. Eine weitere Chromatographie an CM-Sephadex ergab eine Auftrennung in vier ninhydrinpositive Fraktionen, von denen nur der zuletzt eluierte Gipfel bei 280 nm eine nennenswerte Extinktion aufwies (Abb.15).

Die Aminosäurezusammensetzung der beiden kleinen Gipfel a und b ließ keine brauchbare Interpretation zu (Spalten 7 und 8 der Tab.22). A-T-IV-1c erwies sich als N-terminales Pentapeptid der A-Kette (Spalten 2 und 3 der Tab.22).

In der vierten, tryptophanhaltigen Fraktion dieser Rechromatographie fand sich das Nonapeptid A-T-IV-1d (Spalten 4 bis 6 der Tab.22), dessen Isolierung in gereinigtem Zustand auch durch eine Gelfiltration von Material des Peaks A-T-IV-1 über Biogel P-2 in 0,1 M NH_4HCO_3 bei pH 7 erreicht werden konnte.

Nachdem das Peptid A-T-IV-1d keinen Argininrest enthält und die Aminosäureanalysen der beiden Fraktionen A-T-IV-1a und -b ebenfalls keine nennenswerten Argininmengen aufwiesen, mußte der gesamte Arginingehalt des Materials A-T-IV-1 (Spalte 1 der Tab.22) aus dem N-terminalen Pentapeptid Ile-Ile-Gly-Gly-Arg stammen. Somit ließ der aufgefundene Wert von 0,49 μMol Arginin auf eine etwa 45 %ige Spaltung der Bindung Arg(5)-Glu(6) schließen. Mit 0,39 μMol dieses Peptids in der Fraktion A-T-IV-1c lieferte die Rechromatographie etwa eine Ausbeute von 70 %, sodaß sich die Gesamtausbeute auf ca. 30 % belief.

Weiter läßt sich aus dem Gehalt der Fraktion A-T-IV-1 an Thr,

Tab.22 Aminosäurezusammensetzung der Fraktionen A-T-IV-1, A-T-IV-1c und A-T-IV-1d
(Ein-Stäulen-System; Reste pro Molekül)

Amino- säuren	1 2 3 4 5 6 7 8							
	A-T-IV-1	A-T-IV-1c	A-T-IV-1d	A-T-IV-1d	A-T-IV-1a	A-T-IV-1b		
	μmol	Reste ber.	Reste Ganzz.	Reste ber.	Reste Ganzz.	Sequenz Position (35)bis(43)	nmol	nmol
Asp	0,45	0,26		0,12	1	1	40,1	15,1
Thr	0,78	0,06		1,04			14,4	36,6
Ser	0,20	0,11		0,21			19,3	8,3
Glu	0,27	0,13		0,05			20,8	9,7
Pro	<0,04	<0,02		<0,02			5,2	<1
Gly	1,19	1,95	2	0,15			16,2	10,4
Ala	1,56	0,13		1,96	2	2	11,4	55,0
CM-Cys	0,86	0,10		1,01	1	1	5,2	39,0
Val	0,89	0,11		0,97	1	1	3,4	25,9
Met	<0,04	<0,02		<0,02			<1	<1
Ile	0,59	1,70 ^a	2	0,02			12,3	7,3
Leu	0,83	0,12		0,98	1	1	15,2	36,2
Tyr	0,15	0,09		0,05			14,3	50,0
Phe	<0,04	<0,02		<0,02			7,8	1,1
Lys	0,99	0,13		1,06	1	1	2,1	1,6
His	0,84	0,09		0,94	1	1	1,3	26,7
Arg	0,49	1,05	1	<0,02	1	1	<1	6,3
Trp				1,18 ^b				
Summe			5		9	9		

a 160-h-Hydrolyse b aus E₂₈₀

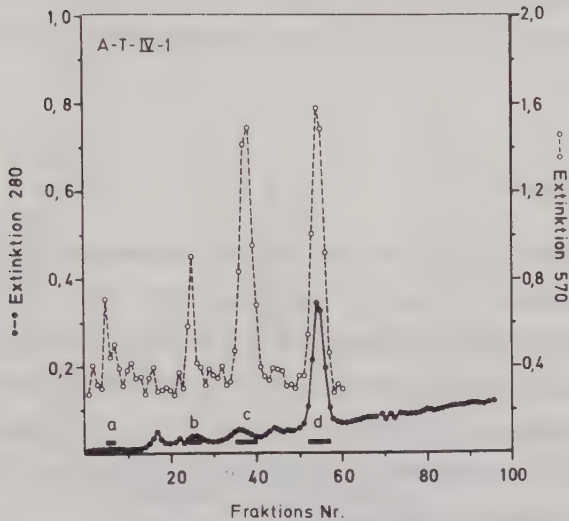


Abb.15 Rechromatographie der gesamten Fraktion A-T-IV-1 (Abb.11) an CM-Sephadex C-25 mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 M bis 1,2 M TEAA, pH 4,5.

Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 400 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 16 ml/h und die Fraktionsgröße 2,7 ml. Proben von 0,25 ml pro Fraktion wurden zur Ninhydrindetektion eingesetzt.

Ala, CM-Cys, Val, Leu, Lys und His (Spalte 1 der Tab.22) entnehmen, daß die Ausbeute des Nonapeptids A-T-IV-1d nach der Gelfiltration des tryptischen Spaltgemisches mit ca. 0,85 μ Mol etwa 80 % der eingesetzten Menge an A-Kette betrug. Nach der Rechromatographie

matographie an CM-Sephadex wurden davon jedoch nur noch 0,38 μ Mol wiedergewonnen, so daß die Gesamtausbeute dieses Peptids nur 25 % erreichte.

Peptid A-T-IV-2

Da der Gipfel A-T-IV-2 bei der Gelfiltration (Abb.11) zusammen mit Guanidiniumchlorid eluiert worden war, führten wir eine Entsalzung der Peakfraktionen an Biogel P-2 durch (Abb.16). Die Aminosäurezusammensetzung der Hauptfraktion nach der Entsalzung zeigte ein Peptid mit 10 Resten (Tab.23). Die Ausbeute des tryptischen Dekapeptids A-T-IV-2 betrug mit 0,61 μ Mol ca. 55 % der zur Spaltung eingesetzten Menge an A-Kette.

3. Sequenz der A-Kette

Mit einem automatischen Sequenator nach P. Edman et al. (42) konnte im Laboratorium von Dr. Tschesche die Sequenz von 40 N-terminalen Aminosäuren an aminoäthylierter A-Kette ermittelt werden, die wir durch eine zusätzliche Gelfiltration über Sephadex G-75 in 50 %iger Essigsäure von restlichen Beimengungen befreit hatten (vgl. Spalte 2 der Tab.7).

Der tryptische Abbau carboxymethylierter A-Kette erbrachte fünf

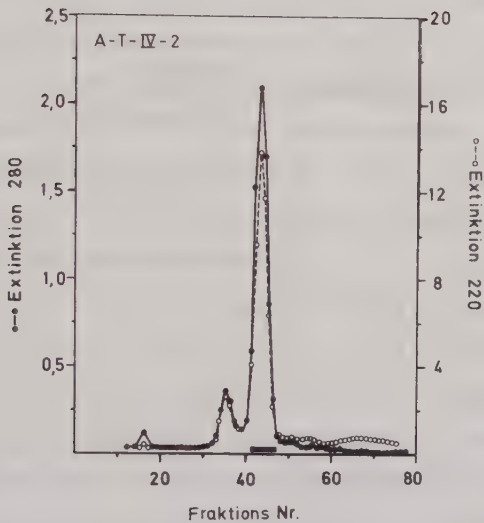


Abb.16 Gelfiltration der gesamten Fraktion A-T-IV-2 (Abb.11) über Bio-gel P-2
Die Säule (142 x 0,9 cm) war mit 0,1 M NH_4HCO_3 , pH 8 äquilibriert, wurde mit ca. 6 ml/h betrieben, und Fraktionen mit 1,2 ml wurden gesammelt.

Tab.23 Aminosäurezusammensetzung des Peptids A-T-IV-2
(Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül)

Amino- säuren		Reste ganzzahl.	Sequenz Position (44)bis(53)
Asp	3,07	3	3(2Asn)
Thr	0,03		
Ser	0,09		
Glu	1,08	1	1
Pro	< 0,01		
Gly	1,10	1	1
Ala	0,05		
CM-Cys	< 0,01		
Val	1,02	1	1
Met	0,01		
Ile	0,04		
Leu	0,99	1	1
Tyr	1,01	1	1
Phe	< 0,01		
Lys	0,01		
His	0,01		
Arg	0,96	1	1
Trp	1,10 ^a	1	1
Summe		10	10

^a aus E₂₈₀

Hauptpeptide (Spalten 2 bis 6 der Tab.24). Die Summe ihrer Aminosäurebausteine ergab die vollständige Aminosäurezusammensetzung der A-Kette. Die beiden Peptide A-T-IV-1c mit 5 und A-T-III-1 mit 29 Resten sind offensichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung nach Bestandteile des bereits sequenzierten Bereichs der A-Kette (vgl. Schema 1). Die Einordnung der restlichen drei Peptide in die Gesamtsequenz konnte anhand folgender Überlegungen vorgenommen werden:

Das vollständige Fehlen von Arginin und Lysin wies A-T-II als carboxylendständiges tryptisches Peptid aus. Eine Bestätigung dafür sahen wir in dem nicht ganzzahligen Seringehalt dieses Peptids, der der teilweisen Abspaltung des C-terminalen Serins der A-Kette entsprach. Eine weitere Bestätigung für die C-terminale Position von A-T-II fanden wir mit der Isolierung des Peptids A(AE,mal)-T-II nach der tryptischen Spaltung aminoäthylierter, maleylierter A-Kette. Die Aminosäurezusammensetzung beider Peptide zeigte völlige Übereinstimmung (Spalten 6 und 12 der Tab.24). Bei dieser Spaltung der A-Kette erhielten wir neben dem 27-Reste-Peptid A(AE,mal)-T-II nur ein einziges weiteres Fragment, A-(AE,mal)-T-I, das mit 53 Aminosäuren alle übrigen Reste einschließlich sämtlicher Arginin- und Lysinreste der A-Kette umfaßte. Da das 53-Reste-Peptid A(AE,mal)-T-I durch eine spezifisch arginingerichtete Spaltung entstanden war, mußte es als C-Terminus einen Argininrest tragen. Mit dem Peptid A-T-IV-2 erhielten wir bei der tryptischen Hydrolyse

carboxymethylierter A-Kette außer dem bereits zugeordneten A-T-IV-1c ein einziges weiteres lysinfreies, jedoch argininhaltiges Produkt. Da mit Arg(5) die Position eines der beiden Argininreste der A-Kette bekannt war, mußte das Dekapeptid A-T-IV-2 durch Spaltung der zweiten Arginylbindung der A-Kette entstanden sein. Der vermutlich C-terminale Argininrest dieses Peptids mußte also mit dem C-terminalen Arginin des 53-Reste-Peptids identisch sein. Demzufolge mußte das Dekapeptid A-T-IV-2 die Positionen (44) bis Arg(53) der A-Kette einnehmen.

Weiterhin ließ die Freisetzung des Peptids A-T-IV-2 erwarten, daß sich in der Position (43) der A-Kette ein Lysinrest befinden würde. Nachdem die Sequenzanalyse der A-Kette in der Position (34) ebenfalls einen Lysinrest gezeigt hatte, sollte somit bei der tryptischen Hydrolyse ein Peptid entstanden sein, von dessen neun Aminosäuren bereits sieben bekannt waren. Dieses Nonapeptid wurde als A-T-IV-1d erhalten. Sein Aminosäuregehalt entsprach der erwarteten Zusammensetzung (Spalte 4 der Tab.24).

Zusammenfassend führten die dargestellten Überlegungen zu folgendem Ergebnis: Das Peptid A-T-IV-1d umfaßt die Positionen Trp(35) bis Lys(43) der A-Kette; darauf folgt von den Positionen (44) bis Arg(53) das Peptid A-T-IV-2, und die C-terminalen 27 Reste der A-Kette von Position (54) bis zu Ser(80) werden von dem Glykopeptid A-T-II gebildet.

Tab.24 Übersicht über die isolierten tryptischen Peptide der A-Kette

Positionen	1-80	1-5	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aminosäuren	A-Kette	A-T-IV-1c	A-T-III-1	A-T-IV-1d	A-T-IV-1d	A-T-IV-2	A-T-II	A-T-III-2	A-T-III-1	A-T-IIIa-3a	A-T-IIIa-3b	A(AE-mal)-T-I	A(AE-mal)-T-II
Asp	10		2			3	5	2	1	1		5	5
Thr	3			1			2					1	2
Ser	4		3			1	1	3		1		3	1
Glu	8		4			1	3	4	1	1	2	5	3
Pro	4		2			2	2	4	1	1		2	2
Gly	7	2	2			2	2	4	2	1	2	5	2
Ala	5		1	2			2	1	1		1	3	2
Cys/2	3		2	1				2		1		3	
Val	6		3	1		1	1	3	2			5	1
Met													
Ile	3	2	1					3		1	2	3	
Leu	5		1	1		1	2	1	1			3	2
Tyr	3		2			1		2		1		3	
Phe	6		1			1	5	1			1	1	5
Lys	3		2	1			2	2	1	1		3	
His	5		2	1			2	2	1		1	3	2
Arg	2	1				1		1		1		2	
Trp	3		1	1		1		1				3	
Summe	80	5	29	9		10	27	34	10	10	9	53	27
Ausbeuten in %		a: 45	40	80		55	90	20	3	2	8	55	
		b: 30		25			60						

a Ausbeuten nach Gelfiltration (Abb.11)
b Gesamtausbeuten nach Weiterreinigung

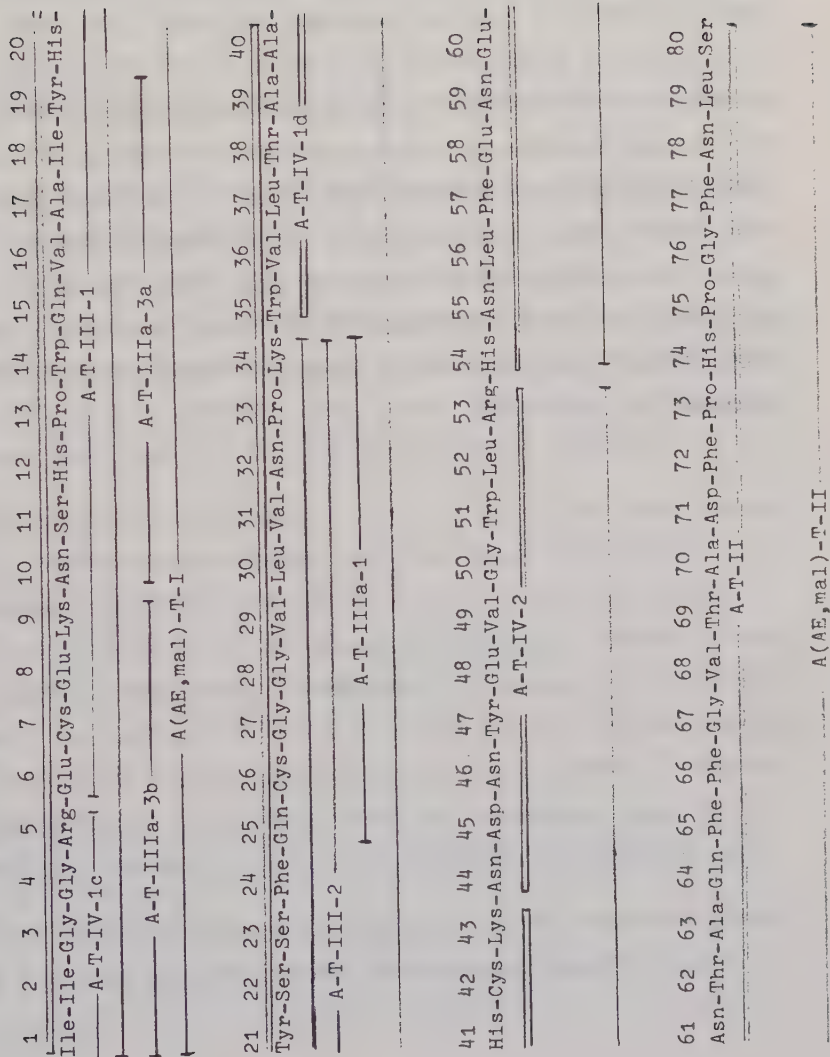
Da die Peptide A-T-IV-1d und A-T-II bei der Gelfiltration des tryptischen Spaltansatzes jeweils in 80 bzw. 90 %iger Ausbeute aufgefunden wurden, mußte das Ausmaß der Spaltung an Lys(34), Lys(43) und Arg(53) jeweils bei mindestens 80 % liegen.

Alle drei erwähnten Peptide konnten mit Erfolg vollständig sequenziert werden. Die Ergebnisse der Sequenzanalysen bestätigten unsere Interpretationen: Die vollständige Sequenz der A-Kette ist im Schema 1 dargestellt.

Jene Peptide, die über diese fünf Hauptpeptide hinaus in tryptischen Hydrolysaten der A-Kette ermittelt worden waren (Zusammenstellung in den Spalten 7 bis 12 der Tab.24) ließen sich ohne Schwierigkeiten in das Schema der Sequenz der A-Kette einfügen.

In dem Peptid A-T-II (identisch mit A(AE,mal)-T-II) wurden als einzigem bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung erhebliche Mengen Glucosamin gefunden, so daß dieses C-terminale 27-Reste-Peptid wohl den (oder die) Polysaccharidbestandteile der A-Kette tragen dürfte. Die beiden in Proteinen bisher allein aufgefundenen Typen von Carbohydrat-Peptid-Verknüpfungen bestehen aus der Bindung von N-Acetylglucosamin an die Amidgruppe eines Asparaginrestes und der O-glycosidischen Bindung von N-Acetylgalactosamin an Threonin oder Serin (54). Die Bestimmung der Kohlehydratbestandteile des Kallikreins (Tab.1) hatte nur das Vorhandensein von Glucosamin, nicht jedoch von Galactosamin gezeigt. Somit besteht Grund zu der Annahme, daß die Zuckerbe-

Schema 1 Sequenz der A-Kette (===== sequenzierte Bereiche)



standteile der A- ebenso wie diejenigen der B-Kette über N-Acetylglucosamin an Asparagin gebunden vorliegen. Wie durch viele Beispiele belegt ist (54), folgt in Glycoproteinen ganz allgemein auf den an Zucker gebundenen Asparaginrest in der übernächsten Position in Richtung auf den C-Terminus eine der 3-Hydroxy-Aminosäuren Threonin oder Serin. Sollte diese Sequenz auch in der A-Kette des Kallikreins für die Polysaccharidbindungsstelle charakteristisch sein, so kommt dafür innerhalb des Peptids A-T-II nur Asparagin(78) in Frage. Es wird die Aufgabe weiterer Untersuchungen in unserem Arbeitskreis sein, diese Hypothese zu überprüfen.

V. B-Kette

1. Trypsinspaltung aminoäthylierter und maleylierter B-Kette

Wie bereits bei der tryptischen Spaltung der A-Kette lag es nahe, auch bei der Fragmentierung der B-Kette den geringen Gehalt an Arginin zur Gewinnung großer tryptischer Bruchstücke zu nutzen. Die Spaltung an der einzigen Arginylbindung ließ zwei Bruchstücke erwarten, deren Einordnung in die Sequenz einfach durchzuführen sein sollte. Eine ähnliche Größe dieser beiden Peptide hätte die weitere Fraktionierung der B-Kette wesentlich erleichtert.

Die tryptische Spaltung aminoäthylierter und maleylierter B-Kette wurde am Autotitrator durchgeführt. Der Laugeverbrauch bis zum Stillstand der Reaktion entsprach etwa 0,8 Äquivalenten einer Peptidbindung. Noch vor der Deacylierung wurde mit Material dieses Spaltansatzes eine Aminoendgruppenbestimmung nach der Dansylmethode durchgeführt. Da das N-terminale Alanin der B-Kette hierbei noch durch die Maleylgruppe blockiert war, wurde als einzige Endgruppe Leucin aufgefunden. Damit war anzunehmen, daß, wie beabsichtigt, nur eine Bindung der B-Kette gespalten worden war.

Bei der SDS-Elektrophorese von Material des Spaltansatzes zeigte sich eine einzige Bande, deren Beweglichkeit gegenüber ungespal-

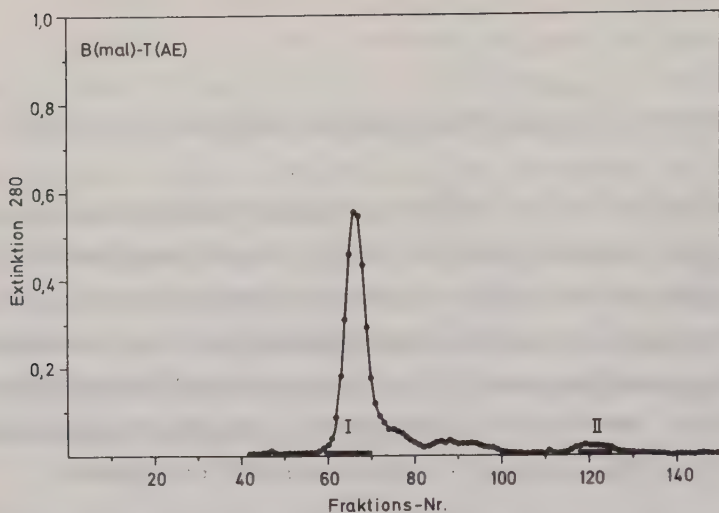


Abb.17 Auftrennung eines tryptischen Hydrolysates amino-
 äthylierter, maleylierter B-Kette ($0,58 \mu\text{Mol}$)
 durch Gelfiltration an Sephadex G-75 ($140 \times 2 \text{ cm}$)
 in 50 %iger Essigsäure
 Die Elutionsgeschwindigkeit betrug ca. 10 ml/h ,
 die Fraktionsgröße $3,0 \text{ ml}$.

tener B-Kette nur um ca. 10 % vergrößert war. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, daß die tryptische Spaltung am einzigen Argininrest der B-Kette nur ein verhältnismäßig kleines Peptid aus einem terminalen Bereich der B-Kette entfernt hatte. Somit war das Elutionsdiagramm der Gelfiltration des Spaltan-

satzes nach der Deacylierung der Aminogruppen auch ohne Verwendung der Ninhydrindetektion unschwer zu interpretieren (Abb.17). Das erwartete relativ kleine Peptid fand sich in dem flachen Gipfel um Fraktion 120. Entsprechend seiner Elutionsposition wurde es mit B(AE,mal)-T-II bezeichnet. Die Bestimmung seiner Zusammensetzung ergab ein Peptid mit 14 Aminosäuren (Spalten 1 und 2 der Tab.25). Die geringe Extinktion bei 280 nm ließ auf die Abwesenheit von Tryptophan schließen. Der Gehalt dieses 14-Reste-Peptids an Arginin wies auf eine N-terminale Position. Die Fraktion B(AE,mal)-T-I enthielt völlig argininfreies Material einer Aminosäurezusammensetzung, die weitgehend derjenigen der B-Kette nach Abzug der 14 Reste von B(AE,mal)-T-II entsprach (Spalten 4 und 5 der Tab.25). Aminosäureanalysen des in vier Fraktionen vereinigten restlichen Säuleneluates erbrachten keinen Hinweis auf weitere Bruchstücke.

Neben der Argininverteilung ergab auch die Aminoendgruppenbestimmung nach der Dansylmethode, daß B(AE,mal)-T-II innerhalb der B-Kette eine N-terminale Position einnehmen mußte. Dieses 14-Reste-Peptid enthielt mit Alanin die gleiche Aminoendgruppe wie die B-Kette. Die nach der Spaltung neu aufgetretene Endgruppe Leucin wurde als der N-Terminus des Materials B(AE,mal)-T-I bestimmt.

Tab.25 Aminosäurezusammensetzung der Peptide nach der Trypsin-spaltung aminoäthylierter, maleylierter B-Kette (Zwei-Säulen-System; Reste pro Molekül)

Amino- säuren	B(AE,mal)-T-II		B(AE,mal) -T-I	B-Kette minus B(AE,mal) -T-II
	Reste ganzz.	Sequenz		
Asp	3,16	3	13,44	15
Thr	0,08		12,31	12
Ser	0,99	1	8,91	9
Glu	0,10		15,62	15
Pro	0,05		11,33	12
Gly	1,01	1	14,61	14
Ala	0,78	1	6,97	7
AE-Cys	< 0,02		4,74	7
Val	0,02		3,82	4
Met	0,73	1	2,93	3
Ile	0,07		8,84	9
Leu	3,02	3	12,32	12
Tyr	0,93	1	3,10	3
Phe	< 0,02		4,03	4
Lys	0,90	1	5,51	6
His	0,92	1	2,16	2
Arg	0,96	1	< 0,02	
Trp				4
Summe		14		

2. Bromcyanspaltung aminoäthylierter B-Kette

Nachdem die tryptische Spaltung aminoäthylierter, maleylierter B-Kette nur 14 Reste vom Aminotermius entfernt hatte, war eine wesentliche Erleichterung der Fraktionierung der übrigen 138 Aminosäurereste dadurch nicht zu erwarten. Deshalb wurde die Bromcyanspaltung an intakter B-Kette durchgeführt.

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Materials vor und nach der Inkubation mit Bromcyan (Spalten 1 und 2 der Tab. 26) ergab einen Rückgang des Gehaltes an Methionin im Verlaufe der Spaltung auf ca. 6 % des Ausgangswertes. Dies sollte einer 94 %igen Spaltung der Methionylbindungen entsprechen. Aus technischen Gründen konnte bei allen Aminosäureanalysen der vorliegenden Arbeit Homoserin nicht abgetrennt von Glutaminsäure bestimmt werden, so daß der Homoserin Gehalt nur gemeinsam mit dem Wert für Glutaminsäure angegeben werden kann (vgl. Methoden). Das Auftreten von ca. zwei Resten Homoserinlacton und der Anstieg der Summe des Gehaltes an Glutaminsäure und Homoserin um ebenfalls zwei Reste entsprach etwa der erwarteten Menge an Reaktionsprodukten des Methionins.

Nach der Gelfiltration des Spaltansatzes über Sephadex G-75 in 50 %iger Essigsäure ergab sich ein Elutionsdiagramm, das bei 280 nm mit demjenigen der Bromcyanspaltung carboxymethylierter B-Kette nahezu identisch war (Abb.18). Es wurde deshalb nicht gesondert wiedergegeben.

Bei der SDS-Elektrophorese zeigte das Material des Gipfels I eine einzige Bande mit einer elektrophoretischen Beweglichkeit, vergleichbar derjenigen von Cytochrom c. Das Gel mit Material des Gipfels II wies ebenfalls nur eine Zone auf; die Wanderungstrecke dieser Bande war erwartungsgemäß wesentlich größer als diejenige der Fraktion I.

Die Berechnung der Aminosäurezusammensetzung des Materials I wurde auf der Basis eines Argininrestes durchgeführt. Damit errechnete sich in Übereinstimmung mit der Größenabschätzung durch die SDS-Elektrophorese ein Peptid mit etwa 75 Aminosäuren (Spalten 3 und 4 der Tab.26), das mit B-CB-I bezeichnet wurde. Die Aminosäureanalyse des Toluolsulfonsäurehydrolysats ergab einen Gehalt von einem Tryptophanrest. Dieses Ergebnis stimmte mit der Berechnung über E_{280} überein (vgl. Methoden).

Die Aminosäurezusammensetzung des Gipfels II wies auf ein Bromcyanpeptid mit ungefähr 35 Aminosäureresten (Spalten 5 und 6 der Tab.26), das entsprechend seiner Elutionsposition mit B-CB-II bezeichnet wurde. Bei der Ermittlung des Tryptophangehaltes ergaben beide Bestimmungsmethoden übereinstimmend drei Reste. Weiter zeigte die Aminosäureanalyse von Toluolsulfonsäurehydrolysaten mit 4,3 Resten Glucosamin, daß nahezu der gesamte Bestand der B-Kette an diesem Aminosucker an das Bromcyanpeptid B-CB-II gebunden auftrat.

Quantitativ durchgeführte Aminosäureanalysen ergaben, daß von 0,79 μ Mol auf die Sephadexsäule aufgebrachter bromcyanbehandelter B-

Tab.26 Aminosäurezusammensetzung aminoäthylierter B-Kette vor und nach der Inkubation mit Bromcyan; Zusammensetzung der Bromcyanpeptide B-CB-I und B-CB-II

(Zwei-Säulen-System; Reste pro Molekül)

	1	2	3	4	5	6
Aminosäuren	B-Kette vor BrCN	B-Kette nach BrCN	B-CB-I ^c	B-CB-II ^c		
				Reste ganzz.		Reste ganzz.
Asp	18,96	17,45	7,39	7	4,00	4
Thr	11,30	11,66	5,50 ^a	5-6	3,98 ^a	4
Ser	9,59	9,99	4,46	4-5	2,39 ^a	2
Glu/Hse	14,89	16,87	12,17	11-12	1,97	2
Pro	13,01	11,55	7,41	7	2,58	2-3
Gly	14,69	14,92	4,75	5	3,06	3
Ala	7,91	8,04	4,84	5	1,02	1
AE-Cys	5,21	5,76	2,65	3	1,14	1
Val	4,31	4,19	3,89	4	0,09	0
Met	3,41	0,22	0,11	(1)	0,02	(0)
Ile	8,22	8,33	2,91	3	4,02	4
Leu	13,42	13,88	8,41	8-9	1,94	2
Tyr	3,92	4,01	0,50	0-1	1,68	2
Phe	4,31	4,31	2,96	3	0,93	1
Lys	5,89	6,01	3,02	3	2,00	2
His	2,91	2,93	1,13	1	0,92	1
Hsl		2,04	0,64		<0,02	0
Arg	0,97	1,04	0,97	1	<0,02	0
Trp	4,04 ^a	4,03 ^a	1,11 ^a	1	2,79 ^a	3
			1,13 ^b		3,22 ^b	
Glucosamin	5,35 ^a	5,26 ^a	0,31 ^a		4,32 ^a	
Summe				72-77		34-35

^a aus 24-h-Toluolsulfonsäurehydrolyse

^b aus E₂₈₀

^c 72-h-HCl-Hydrolyse

Kette 0,72 μ Mol (ca. 90 %) als Peptid B-CB-I und 0,60 μ Mol (ca. 75 %) als Peptid B-CB-II im Eluat erhalten wurden.

Da diese Bromcyanspaltung aminoäthylierter B-Kette mit B-CB-I ein Peptid geliefert hatte, das mit ca. 75 Aminosäuren etwa die Hälfte der gesamten B-Kette umfasste und neben drei Lysinresten und einem Argininrest drei Aminoäthylcysteinreste enthielt, schien es wie bei der A-Kette sinnvoll, durch einen Wechsel des Alkylierungsmittels die Zahl der möglichen tryptischen Spaltstellen zu verringern. Aus diesem Grunde wurde auf eine Identifizierung der restlichen erwarteten tryptophanfreien Bromcyanfragmente aminoäthylierter B-Kette verzichtet.

3. Bromcyanspaltung carboxymethylierter B-Kette

Nachdem das Ergebnis der Bromcyanspaltung aminoäthylierter B-Kette einen Wechsel des Alkylierungsmittels nahegelegt hatte, wurde carboxymethylierte B-Kette zur Bromcyanspaltung eingesetzt.

Dem Gehalt von vier Methioninresten zufolge wurden fünf Bromcyanfragmente erwartet. Um die Lokalisation der neben B-CB-I und B-CB-II noch zu vermutenden drei tryptophanfreien Peptide zu erleichtern, wählten wir zunächst als Elutionsmittel für die Gelfiltration des Spaltansatzes 0,1 M NH_4HCO_3 pH 7, das die Extinktionsmessung im Eluat bei wesentlich kürzeren Wellenlängen als 50 %ige Essigsäure erlaubt. Die Auftrennung des Peptidgemisches an Sepha-

dex G-25 lieferte bei 215 nm ein Elutionsdiagramm mit zwei Gipfeln; erwartungsgemäß zeigte nur der erste der beiden Gipfel eine Extinktion bei 280 nm. Das Material des zweiten Gipfels konnte durch Dünnschichtelektrophorese auf Celluloseplatten bei pH 4,2 in drei Flecken aufgetrennt werden. Dies bestätigte die Vermutung, daß die neben den beiden größeren Peptiden B-CB-I und B-CB-II erwarteten drei weiteren Bromcyanfragmente in diesem zweiten, fast E₂₈₀-freien Gipfel enthalten waren. Bei dem Versuch, die beiden größeren Bromcyanpeptide, die im ersten Gipfel vermutet wurden, durch eine weitere Gelfiltration diesmal über Sephadex G-50, unter den gleichen neutralen Bedingungen aufzutrennen, erhielten wir jedoch überraschenderweise drei statt zwei Gipfel. Der erste und der dritte Gipfel wiesen bei 215 nm im Verhältnis zu 280 nm eine wesentlich geringere Extinktion auf als der zweite Gipfel. Zudem wurde der erste Gipfel beim Ausschlußvolumen der Säule eluiert. Wie weitere Gelfiltrationen, SDS-Elektrophoresen und Aminosäureanalysen zeigten, handelte es sich beim ersten und dritten Gipfel um Material des Bromcyanpeptids B-CB-II, das unter den neutralen Bedingungen der Gelfiltration zur Aggregation neigte. Der zweite Gipfel enthielt das Peptid B-CB-I. Da jedoch die Aminosäurezusammensetzung aller drei Fraktionen auf erhebliche Verunreinigungen schließen ließ, wurde bei weiteren Auftrennungen von Bromcyanpaltansätzen wieder 50 %ige Essigsäure als Elutionsmittel verwendet.

Verschiedene Autoren (55-57) berichteten, daß bereits bei der In-

kubation in 70 %iger Ameisensäure, die als Lösungsmittel für die Bromcyanspaltung häufig verwendet wird, die Spaltung besonders säurelabiler Peptidbindungen eintritt. Deshalb führten wir SDS-Elektrophoresen carboxymethylierter B-Kette vor und nach 48-h-Inkubation in 70 %iger Ameisensäure durch. Es zeigte sich jedoch kein Einfluß der Säurebehandlung auf das elektrophoretische Verhalten der B-Kette.

Die Ergebnisse der SDS-Elektrophorese eines Bromcyanspaltansatzes carboxymethylierter B-Kette deuteten durch das völlige Verschwinden der Zone intakter B-Kette und das Auftreten von zwei neuen Banden, deren relative Beweglichkeit ungefähr derjenigen von B-CB-I und B-CB-II aminoäthylierten Materials entsprach, auf eine weitgehende Spaltung der Methionylbindungen hin. Aminosäureanalysen der B-Kette vor und nach der Bromcyanspaltung (Spalten 1 und 2 der Tab.27) ließen mit rund 90 %igem Abbau des Methioningehaltes einen nicht ganz vollständigen Verlauf der Bromcyanspaltung erkennen. Das Elutionsdiagramm der Bromcyanspaltung carboxymethylierter B-Kette ist in Abb.18 dargestellt.

Außer den beiden Fraktionen mit hoher Absorption bei 280 nm fand sich ein weiterer Gipfel mit verhältnismäßig niedriger Extinktion bei dieser Wellenlänge. Bei der Ninhydrindetektion trat außer diesem Gipfel, der mit B-CB-IV bezeichnet wurde, ein zusätzlicher, verhältnismäßig niedriger Gipfel (B-CB-III) auf.

B-CB-I zeigte bei der SDS-Elektrophorese (Abb.19) eine Zone mit etwas geringerer, B-CB-II eine solche mit wesentlich größerer Be-

Tab.27 Aminosäurezusammensetzung an DEAE-Sephadex rechromatographierter (Abb.7) B-Kette vor und nach der Inkubation mit Bromcyan; Zusammensetzung der Bromcyanpeptide B-CB-I und B-CB-II (Abb.18)
(Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül)

	1	2	3	4	5	6
Aminosäuren	B-Kette vor BrCN	B-Kette nach BrCN	B-CB-I	B-CB-II		
				Reste ganzz.		Reste ganzz.
Asp	17,04	16,79	7,44	7-8	4,16	4
Thr	11,83	11,79	5,88	6	4,32	4
Ser	9,70	9,81	5,06	5	3,10	3
Glu/Hse	14,82	16,44	12,14	11-12	2,93	3
Pro	11,83	12,28	7,60	7-8	2,68	3
Gly	14,79	14,77	4,97	5	2,08	2
Ala	7,88	8,16	5,09	5	1,27	1
CM-Cys	6,86	7,10	3,07	3	1,09	1
Val	4,18	4,10	3,75	4	0,36	0
Met	3,14	0,32	0,04	(1)	0,03	(0)
Ile			2,97	3		4 ^a
Leu			8,48	8-9		2 ^a
Tyr	3,86	4,06	0,47	0-1	1,62	2
Phe	4,06	4,24	2,95	3	1,11	1
Lys	^b	6,75	3,21	3	1,81	2
His	^b	2,97	1,14	1	0,67	1
Hsl		1,08	0,42		< 0,02	
Arg	1,09	0,95	0,92	1	0,08	
Trp				1 ^a		3 ^a
Summe				74-79		36

^a aus Tab.26 übernommen
^b nicht bestimmt

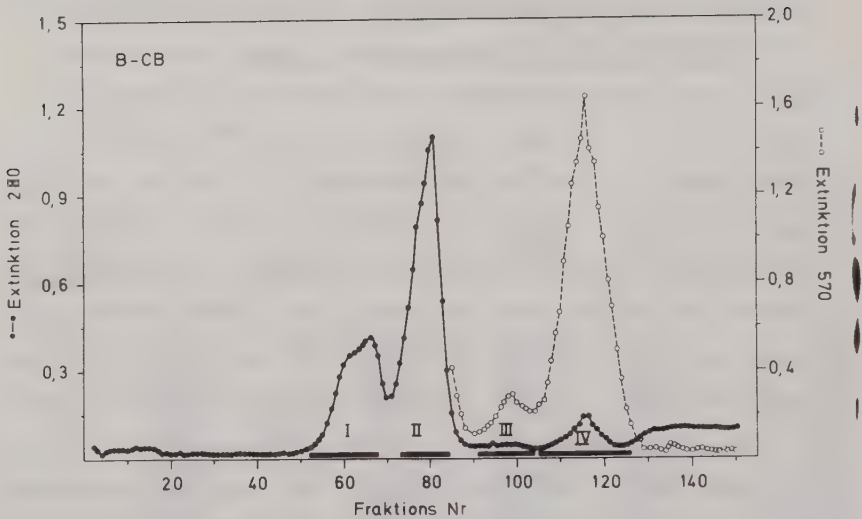


Abb.18 Auftrennung eines Bromcyanspaltansatzes von 2,71 μ Mol carboxymethylierter B-Kette durch Gelfiltration über Sephadex G-75 in 50 %iger Essigsäure
Die Säule (170 x 2 cm) wurde mit ca. 18 ml/h betrieben und Fraktionen von 3,7 ml gesammelt. Für die Ninhydrindetektion wurden Proben von 0,1 ml pro Fraktion eingesetzt. Das Ausschlußvolumen der Säule lag bei Fraktion 48; niedermolekulares Material wurde bei Fraktion 150 eluiert.

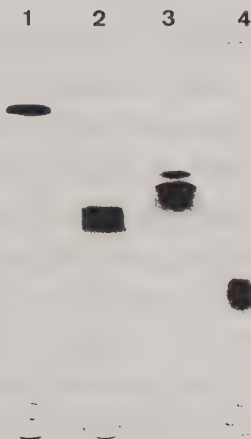


Abb.19 SDS-Elektrophorese (30 V, 17 h) von carboxymethyliertem Material der B-Kette (Gel 1), der A-Kette (Gel 2), des Bromcyanpeptids B-CB-I (Gel 3) und des Bromcyanpeptids B-CB-II (Gel 4)

weglichkeit als carboxymethylierte A-Kette. Den Aminosäureanalysen zufolge (Spalten 3 und 4 der Tab.27) handelt es sich bei B-CB-I um dasselbe zuckerfreie, ca. 75 Aminosäurereste umfassende Peptid, wie es aminoäthylt bereits erhalten worden war. Deshalb überraschte die geringere elektrophoretische Beweglichkeit im Vergleich zur A-Kette, die mit 80 Aminosäureresten und zu-

sätzlichen Kohlehydratbestandteilen deutlich größer sein sollte als B-CB-I. Weitere SDS-Elektrophoresen, auch mit Mischungen beider Materialien, bestätigten jedoch dieses Ergebnis.

Die Auswertung quantitativ durchgeführter Aminosäureanalysen ergab, daß die Ausbeute aus 0,66 μ Mol gespaltener B-Kette an B-CB-I mit 0,48 μ Mol ca. 75 % betrug. Die Ausbeute an Bromcyanpeptid B-CB-II belief sich bei diesem Ansatz mit 0,66 μ Mol auf rund 100 %.

Peptid B-CB-I

Neben der asymmetrischen Form des Gipfels B-CB-I (Abb.18) und der scharfen zusätzlichen Bande bei höherem Molekulargewicht im SDS-Gel dieses Materials (Abb.19) wies vor allem die Aminosäurezusammensetzung dieser Fraktion (Spalte 3 der Tab.27) auf mangelnde Reinheit hin, so etwa durch einen restlichen Methioningehalt von etwa 4 % und vor allem durch das Auftreten eines halben Tyrosinrestes.

In Anbetracht der Größe dieses Peptids, das rund die Hälfte aller Aminosäurereste der B-Kette umfaßt, schien für die nötige weitere Fraktionierung möglichste Einheitlichkeit des Materials eine unerlässliche Voraussetzung. Nachdem eine weitere Gelfiltration des Peptids B-CB-I über Sephadex G-75 in 0,1 M NH_4HCO_3 pH 7 statt der Abtrennung von Verunreinigungen nur zu einem gleichermaßen asymmetrischen Peak mit fast unveränderter Aminosäurezusammensetzung

geführt hatte, versuchten wir, reines Material durch Ionenaustauschchromatographie zu erhalten.

An DEAE-Sephadex wurde das Material mit einem linearen Gradienten von 0,1 bis 1,0 M TEAA bei pH 6,0 etwa bei einer Konzentration von 0,7 M in zwei dicht zusammen liegenden Gipfeln (Ninhydrinfärbung) eluiert. Die Aminosäurezusammensetzung beider Fraktionen ließ jedoch mit 0,56 bzw. 0,44 Resten Tyrosin keine verbesserte Einheitlichkeit des Materials erkennen.

Bei der Rechromatographie von B-CB-I an SP-Sephadex gelang es weder mit einem Gradienten von 0,1 M TEAF pH 2,5 bis 0,1 M TEAF pH 3,5, noch mit einem Konzentrationsgradienten von 0,05 bis 0,1 M TEAF pH 3,5, das aufgesetzte Material zu eluieren. Eine Desorption von dieser Säule konnte erst mit 1,0 M TEAF pH 5,5 erreicht werden. Jedoch auch nach dieser Behandlung enthielt das Material noch 0,25 Reste Tyrosin. Der Grund für diese schlechte Eluierbarkeit dürfte in der später festgestellten Tendenz des Peptids zur Unlöslichkeit bei einem pH-Wert unter 4,5 gelegen haben.

Da zwar bei pH 4,8 mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,1 bis 1,5 M TEAA die Chromatographie von B-CB-I an QAE-Sephadex möglich war, jedoch, wiederum am Tyrosingehalt gemessen, dabei ebenfalls kein nennenswerter Reinigungseffekt erzielt wurde, wollten wir durch einen möglichst linearen pH-Gradienten im Bereich von pH 6,0 bis pH 4,5 eine effektivere Trennung erzielen. Mit Hilfe des Gradientenmischgerätes Ultrograd der Firma LKB ge-

lang es, in diesem Bereich mit je 0,5 M TEAA, pH 6 und pH 4,5 einen absteigenden linearen pH-Gradienten zu erzeugen. Dabei ergab sich eine Auflösung des Materials in vier Gipfel. Der Tyrosingehalt fiel jedoch in keiner dieser Fraktionen unter einen Wert von 0,2 Resten.

Da wegen der Unlöslichkeit des Materials um pH 4 keine Chromatographie möglich war und bei der Chromatographie unter alkalischen Bedingungen keine Reinigung erreicht werden konnte, wollten wir nun versuchen, B-CB-I bei pH 2,5 in 0,1 M Natriumphosphatlösung an SP-Sephadex zu chromatographieren. Hierbei sollte die Zurückdrängung der Carboxylgruppendifsoziation unter den sauren Bedingungen zur Reinigung genutzt werden. Jedoch löste sich das Material in diesem Puffer nicht. Auch der Zusatz von 30 % Isopropanol änderte daran nichts.

Da sich 50 %ige Essigsäure als gutes Lösungsmittel für das Bromcyanpeptid B-CB-I erwiesen hatte, jedoch als Elutionsmittel für die Ionenaustauschchromatographie viel zu sauer erschien, hofften wir, daß die Beibehaltung von 50 %iger Essigsäure selbst nach Abstumpfung des pH-Wertes mit 0,05 M oder 0,1 M NaOH auf einen Wert von ca. pH 2 unter Erhalt der günstigen Lösungseigenschaften eine Chromatographie ermöglichen würden. Tatsächlich konnte durch Verwendung eines solchen Systems mit einem linearen NaCl-Gradienten eine Auflösung von B-CB-I an SP-Sephadex in mehrere Komponenten erzielt werden (Abb.20).

Am deutlichsten zeigte sich der Reinigungseffekt dieser Rechroma-

tographie am Rückgang des Tyrosingehaltes der Hauptfraktion von 0,47 Resten auf 0,04 Reste (Tab.28). Weiter wurde durch die verbesserte Reinheit des Peptids B-CB-I bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung die Festlegung ganzzahliger Werte wesentlich erleichtert, so daß ein Gehalt von 75 Aminosäuren ermittelt werden konnte. Mit Ausnahme eines einzigen zusätzlichen Leucinrestes - der erhaltene Wert von 8,33 Resten tendierte ohnehin nach oben - wurde die so erhaltene Zusammensetzung durch die Zusammensetzung der tryptischen Peptide aus den weiteren Fraktionierungen dieses Materials (s. Tab.39) bestätigt.

Im Hauptgipfel der Rechromatographie von B-CB-I an SP-Sephadex fanden sich 1,11 μ Mol von 2,09 μ Mol (beide aus E_{280}) auf die Säule aufgebrachtem Peptid. Da der ebenfalls aus der Extinktion bei 280 nm ermittelte Tryptophangehalt des Peptids B-CB-I vor und nach der Rechromatographie (Tab.28) nahezu unverändert war, kann daraus auf eine ca. 55 %ige Ausbeute geschlossen werden.

In Verbindung mit der Ausbeute nach der Gelfiltration des Spaltansatzes (s.o.) beläuft sich die Gesamtausbeute an reinem Bromcyanpeptid B-CB-I damit auf ca. 40 %.

Das Material des Gipfels B-CB-Ia (Abb.20) ermöglichte eine zumindest teilweise Erklärung für die Herkunft des Tyrosingehaltes, der als Indiz für die Verunreinigung des Peptids B-CB-I nach der Gelfiltration des Bromcyanpaltansatzes gedient hatte. Während die Aminosäurezusammensetzung der beiden kleinen Gipfel um Fraktion 10 und um Fraktion 30 keine eindeutige Interpretation zu-

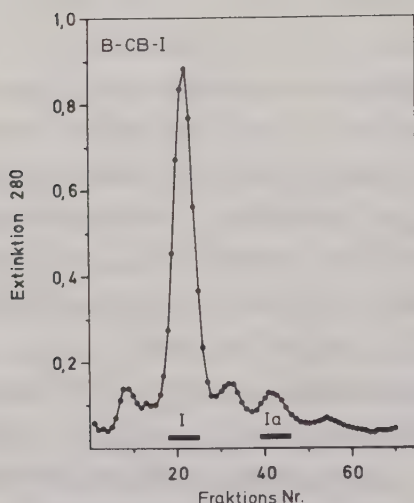


Abb.20 Rechromatographie von 2,09 μ Mol Peptid B-CB-I an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,3 M NaCl in HAc 50 %, 0,1 M NaOH. Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 200 ml, die Elutionsgeschwindigkeit etwa 11 ml/h und die Fraktionsgröße 1,43 ml.

ließ, deutete die Zusammensetzung der Fraktion B-CB-Ia auf ein Peptid hin, das bei sonst gleichem Aminosäuregehalt wie das 76-Reste-Peptid B-CB-I noch einige zusätzliche Aminosäurereste ent-

Tab.28 Aminosäurezusammensetzung des Bromcyanpeptids B-CB-I vor und nach Rechromatographie an SP-Sephadex (Abb. 20), sowie des Bromcyanpeptids B-CB-Ia (Abb.20) (Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül)

Aminosäuren	B-CB-I vor Rechr.	B-CB-I nach Rechromatogr.			
			Reste ganzz.		Reste ganzz.
Asp	7,44	7,02	7	b	(10)
Thr	5,88	6,01	6	5,93	6
Ser	5,06	5,07	5	5,89	6
Glu/Hse	12,14	13,40	13	13,73	13
Pro	7,60	7,03	7	6,57	7
Gly	4,97	4,22	4	5,24	5
Ala	5,09	5,03	5	5,77	6
CM-Cys	3,07	3,07	3	b	(3)
Val	3,75	3,93	4	3,84	4
Met	0,04	<0,01	(1)	0,09	(2)
Ile	2,97	2,80	3	2,96	3
Leu	8,48	8,33	8	9,59	9-10
Tyr	0,47	0,04	0	1,05	1
Phe	2,95	2,96	3	3,07	3
Lys	3,21	2,90	3	3,92	4
His	1,14	0,99	1	1,90	2
Hsl	0,42	0,33		0,28	
Arg	0,92	0,90	1	1,23	1
Trp	1,09 ^a	1,16 ^a	1	0,93	1
Summe			75		86-87

a aus E₂₈₀

b nicht bestimmt

hielt (Tab.28). Bei dem Material B-CB-Ia mußte es sich demzufolge um ein etwa 86 - 87 Aminosäurereste umfassendes Peptid handeln, das durch die unvollständige Spaltung einer an B-CB-I grenzenden Methionylbindung entstanden war. Da die Zerstörung von Methionin durch Bromcyan nicht unbedingt die Spaltung einer Methionylbindung beinhaltet (58), steht der restliche Gehalt von nur 0,1 Resten Methionin nicht im Widerspruch zu dieser Annahme. Die stärkere Adsorption dieses Peptids gegenüber B-CB-I unter den verwendeten Chromatographiebedingungen findet ihre Erklärung in dem Gehalt von zwei zusätzlichen positiven Ladungen durch je einen weiteren Lysin- und Histidinrest. Mit ca. 0,08 μ Mol (E_{280}) entspricht die Ausbeute an diesem Peptid ungefähr 7 % der isolierten Menge des Peptids B-CB-I und somit etwa 3 % der eingesetzten Menge B-Kette.

Peptidchromatographie an SP-Sephadex mit einem Salzgradienten in schwach gepufferter 50 %iger Essigsäure

Da die Chromatographie von Peptiden an SP-Sephadex in schwach gepufferter 50 %iger Essigsäure mit einem Salzgradienten wie eben beschrieben zur Reinigung des Bromcyanpeptids B-CB-I entwickelt worden war, sei an dieser Stelle auf die Eigenschaften dieses Systems eingegangen. An vielen Stellen der Arbeiten zur Sequenzanalyse des Kallikreins leistete dieses Chromatographiesystem eine wichtige Hilfe bei der Auftrennung von Peptidgemischen und der endgültigen Reinigung einzelner Peptide, die entweder durch

Chromatographie in wässrigen Systemen nicht rein erhalten wurden oder von Ionenaustauschern nicht mehr desorbiert werden konnten.

Die schwache Pufferung der 50 %igen Essigsäure erfolgte im allgemeinen mit 0,05 M NaOH oder 0,05 M Triäthylamin. Die Messung des pH an der Glaselektrode ergab dabei einen Wert von etwa 2. Bei diesem pH-Wert sollte noch ein erheblicher Anteil der Sulfopropylgruppen des Austauschers dissoziiert sein. Im Gegensatz dazu war anzunehmen, daß die schwächer sauren Carboxylgruppen der Peptide unter diesen Bedingungen weitgehend ungeladen vorliegen. Die Reihenfolge der Desorption von SP-Sephadex durch einen Salzgradienten sollte somit in erster Näherung nur von dem Gehalt an positiv geladenen Seitenketten des Peptids abhängen.

Um die nach Verwendung von NaOH und einem NaCl-Gradienten notwendige Entsalzung zu vermeiden, wurde öfters mit 0,05 M TEA gepufferte 50 %ige Essigsäure in Verbindung mit einem Konzentrationsgradienten von Triäthylamin eingesetzt. Dieses Elutionsmittel weist den Vorzug der Flüchtigkeit auf (59). Gleichzeitig mit der Ionenstärke steigt in diesem System auch der pH-Wert der Lösung an. Das Elutionsverhalten von Peptiden unterscheidet sich bei der Chromatographie im TEAA-System deutlich von jenem im System NaOH/NaCl. So wurden z.B. die zwei Bromcyanpeptide B-CB-I und B-CB-II der Chromatographie in beiden Systemen unterzogen. Beide Peptide wurden im TEAA-System erst bei ca. der doppelten

molaren Salzkonzentration und in wesentlich breiteren Peaks eluiert als im NaOH/NaCl-System.

Mit Ausnahme carboxymethylierter A-Kette konnten sämtliche untersuchten Peptide in einem der beiden Systeme chromatographiert werden. Somit könnte über die Anwendung in der vorliegenden Arbeit hinaus die Chromatographie an SP-Sephadex in den beschriebenen Systemen vor allem für Peptide nützlich sein, die auf Grund ihrer schlechten Löslichkeit oder ihrer Aggregationsneigung der Ionenaustauschchromatographie nur schwer zugänglich sind.

Peptid B-CB-II

Die Zusammensetzung der Fraktion B-CB-II (Abb.18) hatte auf ein Peptid mit ca. 35 Aminosäuren schließen lassen (Tab.26 und 27). Weiter enthielt dieses Peptid nahezu den gesamten Glucosaminbestand (Tab.26) und somit sehr wahrscheinlich den gesamten Kohlehydratanteil der B-Kette (vgl. Kap.IV.3).

Da alle vier Valinreste der B-Kette im Peptid B-CB-I aufgefunden wurden, mußte B-CB-II valinfrei sein. Der restliche Gehalt an dieser Aminosäure konnte somit wie der Gehalt an Tyrosin im Peptid B-CB-I als Reinheitskriterium verwendet werden. Nach der Gel-filtration des Bromcyanspaltansatzes carboxymethylierter B-Kette enthielt die Fraktion II noch 0,36 Reste Valin (Tab.27). Somit war eine weitere Reinigung des Materials erforderlich.

Beim Versuch einer Rechromatographie von B-CB-II an QAE-Sephadex

A-25 mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 bis 1,5 M TEAA, pH 6,0 konnte das Material selbst nach abschließender Elution mit 70 %iger Essigsäure nicht wiedergewonnen werden. Nach den negativen Erfahrungen mit den Rechromatographieversuchen der ebenfalls zur Aggregation neigenden A-Kette konnte dieses Ergebnis nicht überraschen.

Eine zweite Gelfiltration über Sephadex G-50 in 0,1 M Essigsäure erbrachte zwar eine verbesserte Einheitlichkeit des Materials, jedoch zeigte der Wert von 0,11 Resten Valin (Spalte 1 der Tab. 29), daß noch immer Verunreinigungen vorhanden sein mußten.

Da dem Elutionsverhalten bei dieser Gelfiltration zufolge die Aggregationsneigung des Materials im sauren Bereich zurückgedrängt war, wurde anschließend versucht, B-CB-II bei pH 3 an SP-Sephadex C-25 zu chromatographieren. Als Elutionsmittel fand ein linearer Konzentrationsgradient von 0,05 bis 1,0 M Kaliumformiat pH 3,0 Verwendung, wobei im konzentrierteren Puffer zusätzlich 1 M KCl enthalten war. Jedoch konnte eine Elution des aufgesetzten Materials dadurch ebenfalls nicht erreicht werden. Ein weiterer Chromatographiever such, diesmal an CM-Sephadex C-25 unter Verwendung eines linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 2,5 M NaCl in 0,1 M Natriumformiat, pH 2,5 erbrachte das gleiche negative Ergebnis. Erst durch abschließende Elution mit 50 %iger Ameisensäure konnte das Material von der CM-Säule desorbiert werden. Bei einem Rechromatographiever such an CM-Sephadex mit einem

Tab.29 Aminosäurezusammensetzung des Peptids B-CB-II
(Reste pro Molekül)

	1	2	3	4	5
Amino- säuren	nach 2. Gelfiltr. ^a	nach Rechrom. an SP-Seph.	(Abb.21) ^a analog. Mat. ^b	Reste ganzz.	Sequenz
Asp	4,34	4,59	4,54	4-5	5(4Asn?)
Thr	4,59	4,76	4,69	5	5
Ser	2,84	2,92	3,02	3	3
Glu/Hse	2,25	2,05	2,08	2	2(1Gln)
Pro	3,07	2,96	3,24	3	3
Gly	2,94	3,08	3,07	3	3
Ala	1,07	1,02	1,04	1	1
CM-Cys	0,95	0,98	0,95	1	1
Val	0,11	0,02	0,02	0	0
Met	<0,02	<0,02	0,05	(0)	(0)
Ile			4,87	5	5
Leu			2,05	2	2
Tyr	1,79	1,99	2,00	2	2
Phe	0,99	1,00	1,01	1	1
Lys	1,87	1,88		2	2
His	1,02	0,90		1	1
Hsl	<0,02	<0,02			
Arg	<0,02	<0,02		0	0
Trp				(3)	3
Summe				38-39	39

^a Ein-Säulen-System

^b lange Säule Zwei-Säulen-System

Puffer, der aus 5 M Ameisensäure und 0,5 M TEA bestand (pH-Wert an der Glaselektrode 2,2), wurde das aufgesetzte Material nicht retardiert.

Durch eine Kombination der beiden letzteren Systeme versuchten wir eine brauchbare Methode zur Chromatographie des Peptids B-CB-II zu entwickeln. Als Ausgangspuffer wurde 0,1 M TEAF, pH 3,0 verwendet. In dieser Lösung sollte die Adsorption an CM-Sephadex erfolgen. Durch Mischen mit 5 M Ameisensäure wurde ein weitgehend lineares Abnehmen des pH-Wertes bis 1,5 erreicht. Ungefähr die Hälfte der aufgesetzten Peptidmenge wurde dabei in einem breiten Peak zwischen pH 2 und pH 1,5 eluiert. Der Valingehalt dieses Materials ging bis auf 0,09 Reste zurück.

Eine erfolgreiche Reinigung des Bromcyanpeptids B-CB-II in guter Ausbeute gelang jedoch erst durch Verwendung des inzwischen für B-CB-I ausgearbeiteten Systems der Chromatographie an SP-Sephadex C-25 in leicht gepufferter 50 %iger Essigsäure mit einem Ionenstärkegradienten (Abb.21). Den im Verlaufe dieser Rechromatographie erreichten Reinigungsgrad zeigt der Rückgang des Valin gehaltes auf unter ein Zwanzigstel seines Ausgangswertes (Tab. 29). Die errechnete Aminosäurezusammensetzung liegt als weiteres Kriterium für die Einheitlichkeit des Materials in den meisten Fällen dicht beim nächsten ganzzahligen Wert. Eine deutliche Ausnahme bildet der errechnete Gehalt an Asparaginsäure, der etwa in der Mitte zwischen 4 und 5 Resten liegt. Dieser Wert war in verschiedenen Präparationen des Peptids B-CB-II reproduzierbar

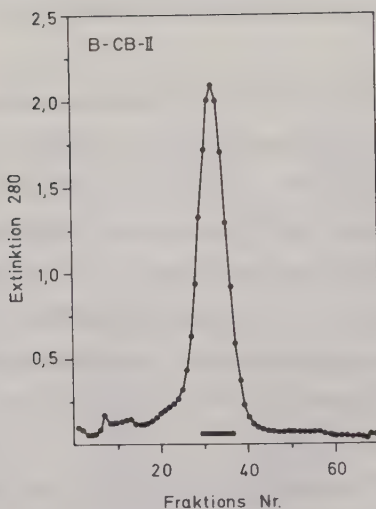


Abb.21 Rechromatographie von 1,51 μ Mol (E_{280}) Peptid B-CB-II an SP-Sephadex C-25 unter Bedingungen identisch mit jenen der Abb.20

(Spalten 2 und 3 der Tab.29). Wie bereits bei der Aminosäurezusammensetzung der B-Kette erwähnt, ließ das Ergebnis der Sequenzanalyse des Peptids B-CB-II-T-1 den Schluß zu, daß der höhere Wert dem tatsächlichen Gehalt an dieser Aminosäure eher entspricht. Die Aminosäurezusammensetzung des Peptids B-CB-II kann somit mit 39 Resten angegeben werden.

Unter den Bedingungen der Abb.21 wurden 87 % der aufgesetzten E₂₈₀ in der Hauptfraktion des Eluates aufgefunden. Mit der 100 %igen Ausbeute des Peptids B-CB-II nach der Gelfiltration des Spaltansatzes lag die Gesamtausbeute an gereinigtem Material somit bei etwa 85 %.

Fraktion B-CB-IV

Da die B-Kette vier Methioninreste enthält, erwarteten wir nach der Spaltung mit Bromcyan ein Gemisch von fünf Peptiden. Die beiden größeren Bromcyanpeptide B-CB-I und B-CB-II enthielten mit 76 bzw. 39 Resten etwa drei Viertel aller Aminosäuren der B-Kette. Das verbleibende Viertel (37 Reste) mußte auf drei kleinere Bromcyanpeptide aufgeteilt sein.

Wie bereits erwähnt, wurde eine Auftrennung zwischen den beiden größeren, tryptophanhaltigen Peptiden B-CB-I und B-CB-II einerseits sowie der Gruppe der kleineren, tryptophanfreien Bromcyanpeptide andererseits durch Gelfiltration des Bromcyanspaltansatzes über Sephadex G-25 in 0,1 M NH_4HCO_3 , pH 7 erreicht. Bei der Dünnschichtelektrophorese von Material des zweiten Gipfels ergab sich mit dem Auftreten von drei gut getrennten Flecken ein deutlicher Hinweis auf das Vorhandensein der drei erwarteten kleineren Peptide. Aus ihrem Elutionsverhalten war zu folgern, daß diese drei kleineren Bromcyanpeptide bei der Gelfiltration des Spaltgemisches über Sephadex G-75 in 50 %iger Essigsäure (Abb.18) in der Fraktion

IV enthalten sein müßte.

Deshalb wurde Material aus diesem Gipfel ebenfalls mit Hilfe der Dünnschichtelektrophorese auf Celluloseplatten untersucht (Abb. 22). Nach Inkubation geeigneter Mengen der Fraktion B-CB-IV für 30 min in 0,1 M NaOH (Abb. 22B) ergab sich das gleiche Muster von drei Flecken, der stark gelb gefärbte davon mit der geringsten Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung Kathode, wie nach der Auftrennung des Bromcyanspaltansatzes an Sephadex G-25 in neutraler Lösung. Somit wurde die Vermutung bekräftigt, daß der Gipfel B-CB-IV das Gemisch der drei noch zu isolierenden Bromcyanpeptide enthielt.

Die Elektrophorese des Materials B-CB-IV, isoliert aus 50 %iger Essigsäure, ohne vorherige Laugebehandlung (Abb. 22A), lieferte fünf Flecken. Es ist bekannt, daß Peptide mit C-terminalem Homoserin bei der Elektrophorese als Paare wandern können, von denen ein Partner Homoserin und der andere Homoserinlacton enthält (60). Die paarige Zusammengehörigkeit von je zwei Peptiden zeigte sich in der vorliegenden Elektrophorese (Abb. 22A) besonders deutlich durch die leuchtend gelbe Farbe der beiden Flecken 3 und 5. Das Auftreten von nur fünf statt der erwarteten sechs Peptide dürfte am Zusammenfallen des jeweils zu Fleck 1 bzw. 4 gehörigen Partners in Fleck 2 gelegen haben.

Nach Armstrong (61) steht in saurer Lösung Homoserin mit Homoserinlacton im Gleichgewicht. In alkalischer und neutraler Lösung ist nur Homoserin stabil. Durch Laugebehandlung kann deshalb der

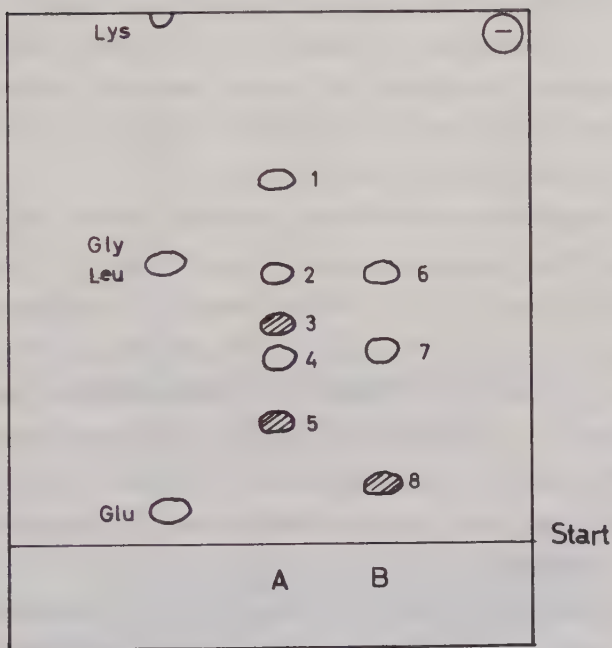


Abb.22 Dünnschichtelektrophorese des Materials B-CB-IV (Abb.18) (500 V, 70 min)
 Anfärbung mit Ninhydrin/Cd-Reagens
 A: Material unmittelbar nach Isolierung aus HAc 50 %
 B: gleiches Material nach 30 min Inkubation in 0,1 M NaOH
 Die schraffierten Flecken zeigten leuchtend gelbe Färbung

Ring des γ -Aminobutyrolactons unter Rückbildung von Homoserin geöffnet werden. Da dabei eine zusätzliche Carboxylgruppe freigesetzt wird, sollte nach Öffnung des Lactonringes nur der jeweils langsamer in Richtung der Kathode wandernde Partner eines Peptidpaares übrig bleiben. Diese Erwartung wurde bei der vorliegenden Elektrophorese bestätigt (Abb.22).

Das gelb angefärbte Peptid 8 wies eine Besonderheit auf. Es entsprach in seiner Wanderungsgeschwindigkeit nicht dem langsameren der beiden Partner 3 und 5, sondern zeigte eine noch wesentlich kürzere Laufstrecke in Richtung der Kathode. Dieses Verhalten ließ sich nur durch eine Zunahme der negativen Ladung des Peptids während der Laugebehandlung erklären. Als naheliegendster Grund dafür kam die Deamidierung eines Asparagin- oder Glutaminrestes unter den alkalischen Bedingungen der Öffnung des Lactonringes in Betracht.

Die Auftrennung der Fraktion IV (Abb.18) in die Komponenten wurde zunächst durch Gelfiltration an Biogel P-2 in 0,1 M NH_4HCO_3 , pH 7 versucht. Jedoch ergab sich dabei nur ein einziger symmetrischer Peak. Daraufhin wurde die präparative Isolierung der drei ähnlichen großen Bromcyanpeptide durch zwei aufeinander folgende Chromatographien der Fraktion B-CB-IV an QAE-Sephadex A-25 erreicht.

Zunächst erfolgte nach 30 minütiger Inkubation des Materials in 0,02 M NaOH eine Chromatographie an QAE-Sephadex A-25 bei pH 4,5 (Abb.23). Dabei ergab sich eine Auftrennung in drei ninhydrinpo-

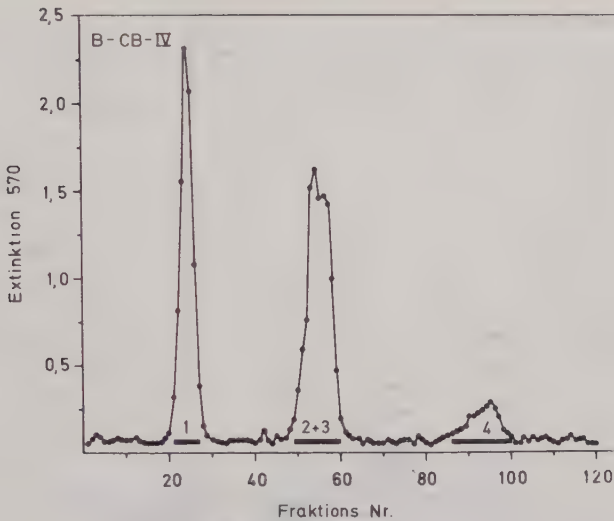


Abb.23 Rechromatographie der Fraktion B-CB-IV (Abb.18) an QAE-Sephadex A-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 bis 0,5 M TEAA pH 4,5. Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 300 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 15 ml/h und die Fraktionsgröße 1,9 ml. Als Proben für die Ninhydrindetektion wurden 0,1 ml pro Fraktion entnommen.

sitive Fraktionen. Die dünnschichtelektrophoretische Untersuchung dieser drei Gipfel (Abb.24) zeigte, daß das Material der ersten Fraktion einheitlich war und erwartungsgemäß demjenigen Peptid

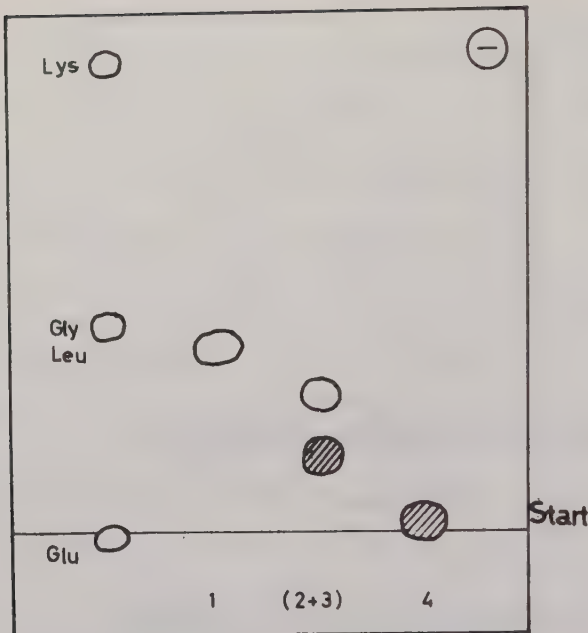


Abb.24 Dünnschichtelektrophorese von Material der einzelnen Gipfel der Abb.23 (500 V, 50 min)
Die schraffierten Flecken zeigten gelbe Anfärbung.

entsprach, das entsprechend der größten Wanderungsstrecke in ,
Richtung Kathode die stärkste positive Ladung aufwies. Die beiden
Flecken, die das Material des zweiten Gipfels bei der Elektrophorese
ergab, ließen darauf schließen, daß die beiden anderen

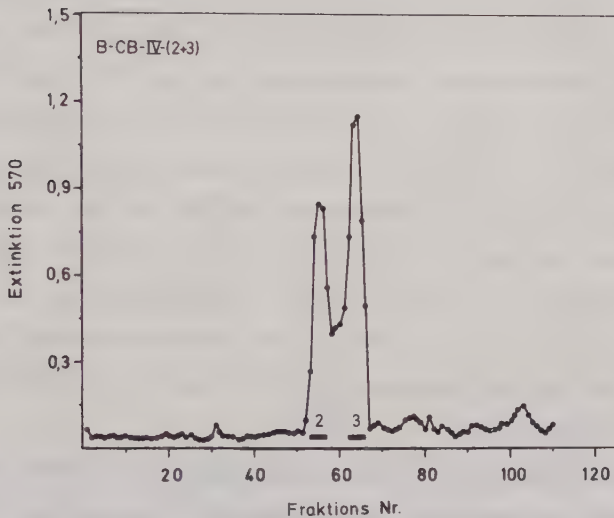


Abb.25 Rechromatographie der Fraktion B-CB-IV-(2+3) (Abb.23) an QAE-Sephadex unter gleichen Bedingungen wie in Abb.23, jedoch bei pH 6,0

ren Bromcyanpeptide gemeinsam in der zweiten Fraktion eluiert worden waren. Der dritte, flache Gipfel (B-CB-IV-4) ließ sich durch das Elutionsverhalten bei der Chromatographie sowie durch Laufstrecke und gelbe Färbung bei der Elektrophorese als wahrscheinliches Deamidierungsprodukt des gelb gefärbten Peptids interpretieren.

Durch Wahl eines pH-Wertes von 6,0 bei sonst gleichen Chromatographiebedingungen konnte das Material des zweiten Gipfels der Abb.23 in zwei Fraktionen aufgetrennt werden (Abb.25). Die dünn-schichtelektrophoretischen Untersuchungen beider Fraktionen ergaben, daß es sich dabei jeweils um einheitliches Peptidmaterial handelte (Abb.26). Die relativen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten und die Anfärbung der beiden Peptide entsprachen denjenigen der beiden Flecken, die bei der Elektrophorese des zweiten Gipfels der Abb.23 erhalten worden waren. In der Reihenfolge ihrer Elution von den beiden QAE-Säulen wurden die drei somit isolierten Bromcyanpeptide mit B-CB-IV-1, B-CB-IV-2 und B-CB-IV-3 bezeichnet.

Außer den Ergebnissen der Dünnschichtelektrophorese zeigte auch die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung, daß alle drei Peptide mit gutem Reinheitsgrad isoliert worden waren (Tab.30). B-CB-IV-1 wurde als Peptid mit 11, B-CB-IV-2 als Peptid mit 12 und B-CB-IV-3 als ein Peptid mit 14 Aminosäuren charakterisiert. Somit entsprach die Summe aller Aminosäurereste der drei "kleinen" Bromcyanpeptide jenen 37 Resten, die als Differenz aus der Zusammensetzung der beiden größeren Bromcyanpeptide und der B-Kette erwartet worden waren.

Die letzten beiden Spalten der Tab.30 geben die Aminosäurezusammensetzung des Gipfels B-CB-IV-4 (Abb.23) wieder. Es zeigt sich, daß dieser Gipfel die gleiche Aminosäurezusammensetzung wie das Peptid B-CB-IV-2 aufweist. Dies bekräftigt die oben angestellte

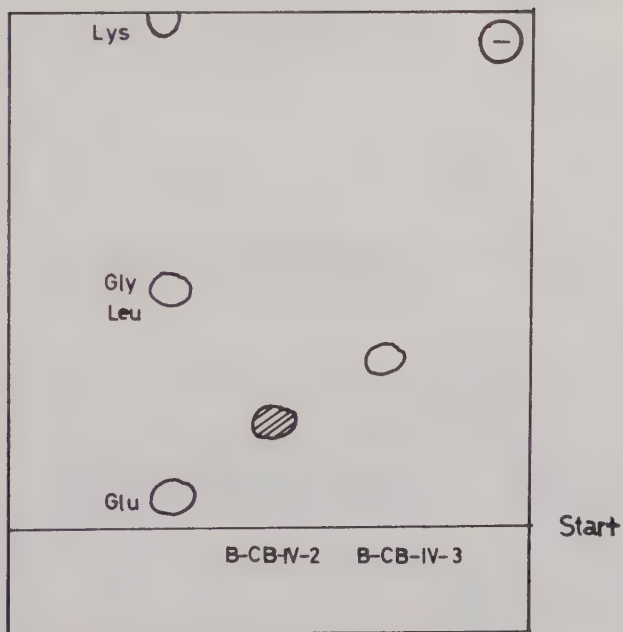


Abb.26 Dünnschichtelektrophorese der beiden Fraktionen B-CB-IV-2 und B-CB-IV-3 (Abb.25) (500 V, 60 min)
Der schraffierte Fleck zeigte gelbe Färbung.

Tab. 30

Aminosäurezusammensetzung der Fraktion B-CB-IV (Abb. 18), der drei Brom-
cyanpeptide B-CB-IV-1, -IV-2 und -IV-3 sowie des Materials der Fraktion
B-CB-IV-4 (Abb. 23)
Ein-Säulen-Methode; Reste pro Molekül

Amino- säuren	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	B-CB-IV (Abb. 18)	B-CB-IV-1	B-CB-IV-2	B-CB-IV-3	B-CB-IV-4	B-CB-IV-4			
μMol	Reste ganzz.	Reste ganzz.	Reste ganzz.	Reste ganzz.	Reste ganzz.	Reste ganzz.			
Asp	6,21	3,04	3	1,93	2	1,03	1	1,98	2
Thr	0,93	<0,02		0,04		1,01	1	0,15	
Ser	2,14	1,01	1	1,01	1	<0,02		0,93	1
Glu/Hse	1,11	0,46		0,55		0,48		0,57	
Pro	2,09	<0,02		1,08	1	1,06	1	1,11	1
Gly	7,35	1,10	1	4,15	4	3,00	3	3,90	4
Ala	2,02	1,00	1	0,07		0,99	1	0,17	
CM-Cys	2,47	0,02		0,97	1	1,94	2	1,09	1
Val	0,03	<0,02		<0,02		<0,02		0,02	
Met	<0,02	<0,02	(1)	<0,02	(1)	<0,02	(1)	<0,02	(1)
Ile	0,97	<0,02		0,86	1	<0,02		0,84	1
Leu	3,68	0,96	1	0,98	1	1,98	2	1,06	
Tyr	2,04	1,00	1	0,04		0,91	1	0,15	
Phe	0,04	<0,02		<0,02		<0,02		<0,02	
Lys	1,92	1,00	1	0,07		0,98	1	0,18	
His	1,14	0,99	1	<0,02		<0,02		<0,02	
Hsl	1,04	0,39		0,34		0,35		0,34	
Arg	<0,02	<0,02		<0,02		<0,02		<0,02	
Summe			11		12		14		12

Vermutung, daß es sich beim Material der Fraktion B-CB-IV-4 um ein wahrscheinlich im Verlaufe der NaOH-Inkubation entstandenes Deamidierungsprodukt des Peptids B-CB-IV-2 handelt.

Die Zusammensetzung des Peptidgemisches (Spalte 1 der Tab.30) in der Fraktion B-CB-IV (Abb.18) läßt sich in den Gehalt an Einzelpeptiden aufteilen, da jedes der drei Pentide jeweils eine Aminosäure enthält, die in keiner der beiden anderen Pentide vorkommt. So ist der Gehalt an Histidin (1,14 μ Mol) charakteristisch für B-CB-IV-1, der Gehalt an Isoleucin (0,97 μ Mol) für B-CB-IV-2 und derjenige an Threonin (0,93 μ Mol) für B-CB-IV-3. Da die Endausbeuten nach der Rechromatographie an jeweils reinen Peptiden (in der gleichen Reihenfolge) 1,11 μ Mol, 0,62 μ Mol und 0,61 μ Mol betragen, beläuft sich die Ausbeute bei der chromatographischen Reinigung auf ca. 95 % B-CB-IV-1 und auf je ca. 65 % B-CB-IV-2 und -IV-3. Zu B-CB-IV-2 bleiben noch jene 0,25 μ Mol des vermutlich deamidierten Produktes zu addieren, die in B-CB-IV-4 aufgefunden wurden.

Bezogen auf die zur Bromcyanspaltung eingesetzte Menge carboxymethylierter B-Kette (2,71 μ Mol), betrug die Gesamtausbeute an gereinigtem B-CB-IV-1 somit ca. 40 %, an reinem Peptid B-CB-IV-2 und -IV-3 je ca. 25 %.

Peptid B-CB-III

Bei der Gelfiltration des Bromcyanspaltansatzes (Abb.18) trat zwischen den Gipfeln B-CB-II und B-CB-IV ein Peak mit nur schwacher

Anfärbung durch Ninhydrin auf, der demzufolge nur geringe Proteinmengen enthalten konnte. Er wurde mit B-CB-III bezeichnet.

Die Dünnschichtelektrophorese dieses Materials (Bedingungen vgl. Abb.22) wies eine einzige Zone mit einer elektrophoretischen Beweglichkeit ähnlich der Glutaminsäure auf. Auf Grund dieses Ladungstyps wurde die Rechromatographie der Fraktion B-CB-III an QAE-Sephadex durchgeführt (Abb.27). Vor Elektrophorese und Chromatographie war die Probe zur Zerstörung von Homoserinlacton 30 min mit 0,01 M NaOH behandelt worden.

Bei der Rechromatographie zeigten sich zwei Peaks, deren Aminosäurezusammensetzung (Tab.31) sich als praktisch identisch erwies. Die stärkere Adsorption von Material des zweiten Gipfels dürfte wiederum auf die Deamidierung eines Säureamids unter alkalischen Bedingungen zurückzuführen sein. Mit ca. 26 Aminosäureresten wies B-CB-III jene Zusammensetzung auf, die von einer Summe der Aminosäurezusammensetzung der beiden Peptide B-CB-IV-2 und -IV-3 zu erwarten war. Somit dürfte es sich bei B-CB-III um ein Überlappungspeptid handeln, das durch die unvollständige Spaltung der Methionylbindung zwischen dem 12-Reste- und dem 14-Reste-Bromcyanpeptid zustande gekommen war.

Quantitativ durchgeführte Aminosäureanalysen erbrachten, daß von 0,20 μ Mol auf die QAE-Sephadex-Säule aufgesetztem Peptid im ersten Gipfel 0,07 μ Mol und im zweiten Gipfel 0,03 μ Mol eluiert worden waren, so daß die Ausbeute bei der Rechromatographie 50 % betrug. Die Gesamtausbeute in Bezug auf 2,71 μ Mol zur Bromcyanpal-

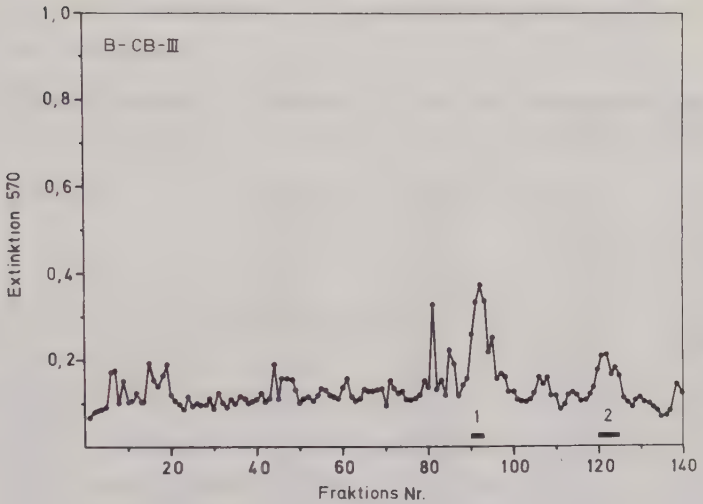


Abb.27 Rechromatographie der Fraktion B-CB-III (Abb.18) an QAE-Sephadex A-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,1 bis 1,5 M TEAA pH 6,0.

Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 400 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 15 ml/h und die Fraktionsgröße 1,1 ml. 0,1 ml pro Fraktion wurden zur Ninhydrindetektion eingesetzt.

Tab.31 Aminosäurezusammensetzung der Fraktionen B-CB-III-1 und B-CB-III-2 (Abb.27)
(Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül)

Amino- säuren	B-CB-III (Abb.18)	B-CB-III -1	B-CB-III -2	Reste ganzz.	B-CB-IV-2 + B-CB-IV-3
Asp	2,88	2,97	2,96	3	3
Thr	1,27	1,05	0,99	1	1
Ser	1,17	0,98	1,09	1	1
Glu/Hse	0,98	0,66	0,80	0	0
Pro	1,73	1,96	1,98	2	2
Gly	5,54	7,02	7,02	7	7
Ala	1,06	1,07	1,06	1	1
CM-Cys	2,18	2,36	2,41	2-3	3
Val	0,12	0,05	0,06	0	0
Met	0,39	0,66	0,51	1+(1)	(2)
Ile	1,08	0,94	1,00	1	1
Leu	2,39	2,70	2,53	3	3
Tyr	0,90	0,99	0,97	1	1
Phe	0,13	0,04	0,04	0	0
Lys	0,97	1,09	1,07	1	1
His	0,15	<0,02	0,02	0	0
Hsl	0,28	0,34	0,53		
Arg	< 0,02	<0,02	<0,02	0	0
Summe				25-26	26

tung eingesetzter B-Kette (Abb.18) belief sich somit auf ca. 4 %.

Trotz der geringen Ausbeute war anzunehmen, daß sich dieses Überlappungspeptid B-CB-III bei der Einordnung der beiden Bromcyanpeptide B-CB-IV-2 und -IV-3 in die Gesamtsequenz der B-Kette (s. u.) als nützlich erweisen würde.

Mit der Isolierung der fünf Bromcyanpeptide B-CB-I, B-CB-II, B-CB-IV-1, -IV-2 und -IV-3, die zusammen sämtliche Aminosäurereste der B-Kette enthielten (s.Tab.38), waren alle erwarteten Bruchstücke der Bromcyanspaltung in reinem Zustand erhalten worden. Jedoch machte der Umfang der beiden größeren Fragmente mit 76 bzw. 39 Aminosäureresten für die Sequenzanalyse eine weitere Aufspaltung in kleinere Peptide notwendig.

4. Trypsinspaltung des Bromcyanpeptids B-CB-II

Die weitere Spaltung des 39-Reste-Glykopeptids B-CB-II wurde mit 0,57 μ Mol an SP-Sephadex rechromatographiertem (vgl. Abb.21) Material am Autotitrator durchgeführt. Nach Ende der Reaktion wurde der mit Eisessig angesäuerte Spaltansatz zur Trockene einrotiert, in 50 %iger Essigsäure aufgenommen und der Gelfiltration an Sephadex G-75 in 50 %iger Essigsäure unterzogen (Abb.28).

Quantitative Aminosäureanalysen ergaben, daß es sich beim Material des ersten Gipfels um 0,09 μ Mol ungespaltenen 39-Reste-Peptids handelte. Das Material des Hauptgipfels wurde durch Rechromatographie an SP-Sephadex C-25 in zwei Peaks aufgetrennt (Abb. 29). Sie wurden entsprechend der Reihenfolge ihrer Elution mit B-CB-II-T-1 und B-CB-II-T-2 bezeichnet. Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung beider Fraktionen zeigte, daß es sich um zwei einheitliche Peptide handelte (Tab.32). B-CB-II-T-1 erwies

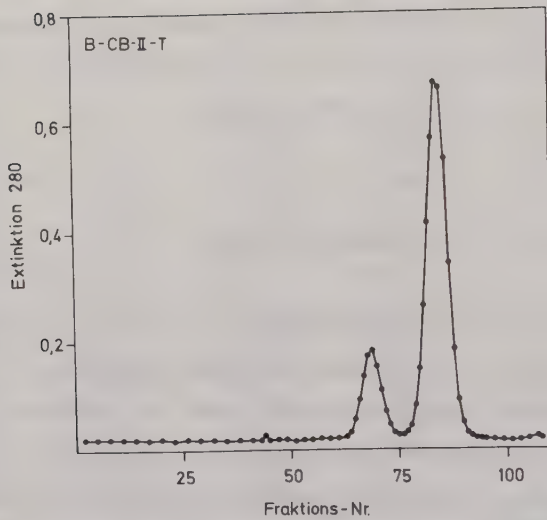


Abb.28 Gelfiltration des tryptischen Spaltansatzes von 0,57 μ Mol B-CB-II an Sephadex G-75 in HAc 50 %. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug ca. 13 ml/h und die Fraktionsgröße 2,15 ml.

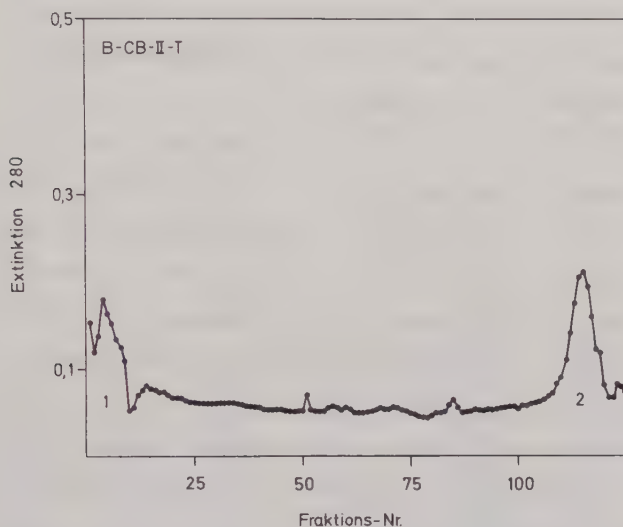


Abb.29 Rechromatographie des Hauptgipfels der Abb.28 an SP-Sephadex C-25 (36 x 0,9 cm)
Als Grundpuffer wurden 150 ml HAc 50 %, 0,05 M TEA verwendet. Dazu wurde als linearer Gradient bis Fraktion 78 0,2 M TEA in HAc 50 % gemischt. Ab Fraktion 79 wurde ein linearer Gradient mit insgesamt 200 ml von 0,2 bis 0,3 M TEA jeweils in HAc 50 % angelegt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug ca. 14 ml/h und die Fraktionsgröße 4,05 ml.

Tab.32 Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Fragmente des Bromcyanpeptids B-CB-II
(Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül)

Aminosäuren	B-CB-II-T-1		B-CB-II-T-2		B-CB-II
	Reste ganzz.		Reste ganzz.		
Asp	3,59	3-4	1,07	1	4-5
Thr	2,17	2	2,89	3	5
Ser	< 0,02	0	3,02	3	3
Glu/Hse	1,12	1	1,02	1	2
Pro	1,07	1	1,94	2	3
Gly	0,15	0	3,15	3	3
Ala	0,04	0	0,99	1	1
CM-Cys	< 0,02	0	0,95	1	1
Val	< 0,02	0	< 0,02	0	0
Met	< 0,02	(0)	< 0,02	(0)	(0)
Ile	2,78 ^a	3	2,14	2	5
Leu	1,79 ^a	2	0,02	0	2
Tyr	1,00	1	0,99	1	2
Phe	1,00	1	0,02	0	1
Lys	< 0,02	0	1,92	2	2
His	< 0,02	0	0,97	1	1
Hsl	< 0,02		< 0,02		
Arg	< 0,02	0	< 0,02	0	0
Trp	1,13 ^b	1	1,62 ^b	2	3
Glucos-amin	(2,24)				
Summe		16		23	39

^a Zwei-Säulen-System; lange Säule

^b aus E₂₈₀

sich als ein Peptid mit 16, B-CB-II-T-2 als ein solches mit 23 Aminosäureresten.

Im Peptid B-CB-II-T-1 fand sich jener Gehalt von rund 3,5 Resten Asx, der bereits mehrfach erwähnt wurde. Er erwies sich auch bei mehrfach wiederholter Aminosäureanalyse als konstant, so daß die Entscheidung zugunsten von 4Asx-Resten in diesem Peptid erst mit Hilfe der Sequenatoranalyse erfolgen konnte (s.u.).

Da die Summe der Aminosäurezusammensetzung beider Peptide jener des 39-Reste-Peptids entsprach, waren in den Peptiden B-CB-II-T-1 und -T-2 die beiden im Verlaufe der tryptischen Spaltung entstandenen Fragmente isoliert worden. Da in B-CB-II-T-1 als einzigem Peptid der B-Kette größere Mengen an Glucosamin nachgewiesen wurden, war anzunehmen, daß der gesamte Polysaccharidteil der B-Kette an einen Asn-Rest dieses Peptids gebunden vorlag.

Mit 0,44 μ Mol betrug die Ausbeute an B-CB-II-T-1 ca. 80 %, diejenige an B-CB-II-T-2 mit 0,33 μ Mol ca. 60 % der eingesetzten Menge des Peptids B-CB-II.

5. Trypsinspaltung des Peptids B-CB-I (CM)

Mit drei Lysinresten und einem Argininrest enthielt das 76-Reste-Peptid B-CB-I vier potentielle Spaltstellen für Trypsin, so daß bei vollständiger tryptischer Spaltung fünf Peptide zu erwarten waren.

Die Trypsinspaltung am Autotitrator wurde mit 0,20 μ Mol durch Chromatographie gereinigtem (vgl. Abb.20) Material durchgeführt. Nach ca. 1 h kam die NaOH-Aufnahme durch die Reaktion zum Stillstand. Der Spaltansatz wurde mit dem gleichen Volumen Eisessig versetzt und der Gelfiltration an Sephadex G-50 in 50 %iger Essigsäure unterworfen (Abb.30).

Die Fraktion B-CB-I-T-I wurde durch Chromatographie an QAE-Sephadex weiter gereinigt (Abb.31). Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung dieses Materials zeigte ein 61-Reste-Peptid mit guter Reinheit (Tab.33). Da dieses Peptid durch seinen Gehalt an Homoserinlacton als C-terminal ausgewiesen wurde, mußte der Gehalt von einem Lysinrest durch die nicht erfolgte Spaltung einer Lysylbindung zustande gekommen sein.

Damit sollte die Fraktion B-CB-I-T-II noch drei weitere tryptische Peptide enthalten. Da sich bis auf jeweils einen Rest von Asx bzw. Glx alle unter neutralen Bedingungen möglicherweise negativ geladenen Seitenketten des Peptids B-CB-I in dem 61-Reste-Peptid B-CB-I-T-I befanden, wurde die Rechromatographie von B-CB-I-T-II an CM-Sephadex durchgeführt (Abb.32). Dabei ergab sich eine Auftrennung des Materials in drei Fraktionen.

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung zeigte (Tab.33), daß es sich bei B-CB-I-T-II-1 und -II-2 jeweils um ein Hexapeptid und bei B-CB-I-T-II-3 um ein Tripeptid von jeweils guter Reinheit handelte.

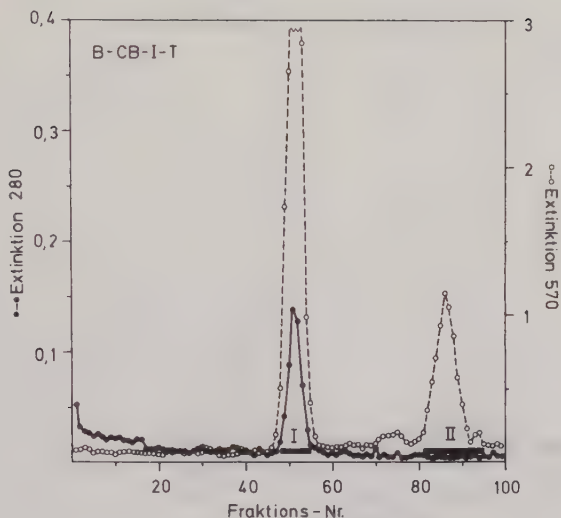


Abb.30 Gelfiltration des tryptischen Spaltansatzes von 0,20 μ Mol B-CB-I (CM) an Sephadex G-50 fine (150 x 1,5 cm) in HAc 50 %. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug ca. 11 ml/h und die Fraktionsgröße 2,25 ml. 0,5 ml einer jeden Fraktion wurden zur Ninhydrindetektion eingesetzt.

Die Ausbeute an dem 61-Reste-Peptid betrug mit 0,15 μ Mol nach der Rechromatographie an QAE-Sephadex ca. 75 % der eingesetzten Menge von 0,20 μ Mol B-CB-I. Die Ausbeuten der drei kleineren Peptide beliefen sich mit je 0,18 μ Mol der beiden Hexapeptide auf

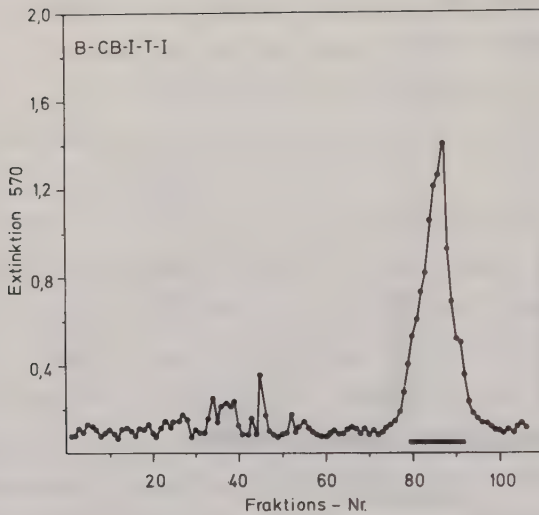


Abb. 31 Rechromatographie der Fraktion B-CB-I-T-I (Abb. 30) an QAE-Sephadex A-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 bis 1,5 M TEAA bei pH 6,0. Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 240 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 13 ml/h und die Fraktionsgröße 1,50 ml. Zur Ninhydrindetektion wurden Proben von 0,2 ml aus jeder Fraktion entnommen.

Tab. 33 Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide des Bromcyanpeptids B-CB-I (CM)
(Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül; nicht aufgeführte Werte < 0,02 Reste)

Aminosäuren	B-CB-I-T-I a	B-CB-I-T-II-1	B-CB-I-T-II-2	B-CB-I-T-II-3	B-CB-I
	Reste ganzz.	Reste ganzz.	Reste ganzz.	Reste ganzz.	
Asp	5,92	1,02	0,06		7
Thr	4,04	0,99	0,03		6
Ser	4,04	0,06	1,04		5
Glu/Hse	11,89	0,03	1,06		13
Pro	6,40	0,02	1,04		7
Gly	4,12	0,05	0,11	0,04	4
Ala	3,04	1,01	0,99		5
CM-Cys	2,94				3
Val	2,95	0,99	0,02		4
Met	(1)				(1)
Ile	1,98				3
Leu	5,79	1,00	0,94	1,96	9
Tyr	0,06				0
Phe	3,04				3
Lys	1,08	0,99			3
His	1,03		0,96		1
Hsl	0,36				
Arg	0,03			1,02	1
Trp	(1)				1
Summe	61	6	6	3	76

a Mittel aus zwei Analysen

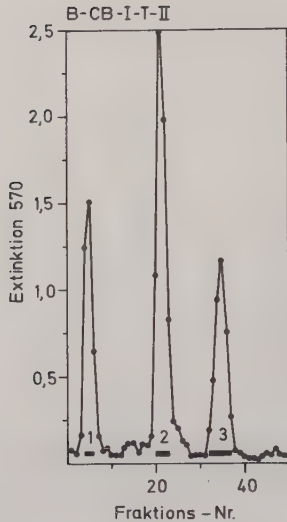


Abb.32 Rechromatographie der Fraktion B-CB-I-T-II (Abb.30) an CM-Sephadex C-25 (40 x 0,4 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 bis 1,0 M TEAA pH 6,0

Das Gesamtvolumen betrug 100 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 7 ml/h und die Fraktionsgröße 0,89 ml. Von jeder Fraktion wurden 0,5 ml zur Ninhydrindetektion eingesetzt.

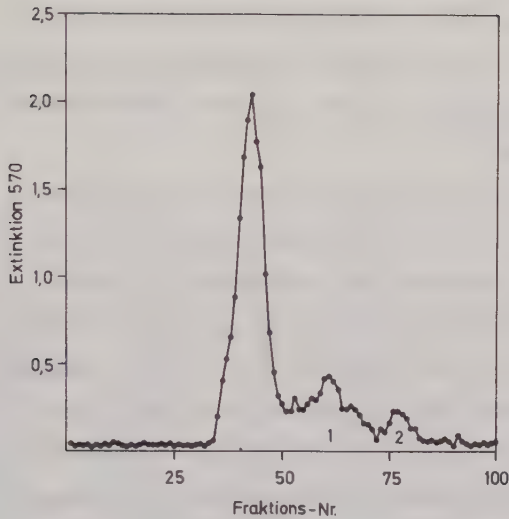


Abb.33 Gelfiltration des Trypsinspaltansatzes von 0,24 μ Mol B-CB-I-T-I an Sephadex G-50 fine (150 x 0,8 cm) in HAc 50 % Die Elutionsgeschwindigkeit betrug ca. 8 ml /h und die Fraktionsgröße 1,05 ml. Von jeder Fraktion wurden 0,2 ml zur Ninhydrindetektion eingesetzt.

90 % und mit 0,20 μ Mol des Tripeptids auf 100 % der eingesetzten Menge.

Somit war zwar bei dieser tryptischen Spaltung die Abtrennung von 15 N-terminalen Resten aus dem 76-Reste-Peptid B-CB-I erreicht worden, jedoch blieb mit einem C-terminalen 61-Reste-Peptid ein für die automatische Sequenzanalyse immer noch wesentlich zu großes Bruchstück.

Deshalb versuchten wir durch eine intensivere Behandlung mit Trypsin die noch ungespaltene Lysylbindung innerhalb des 61-Reste-Peptids B-CB-I-T-I anzugreifen. Dazu wurden 0,24 μ Mol einer weiteren Präparation dieses Peptids eingesetzt. Das Elutionsdiagramm der Gelfiltration dieses Spaltansatzes an Sephadex G-50 in 50 %iger Essigsäure wies neben einem hohen Gipfel zwei verhältnismäßig niedrige Peaks auf (Abb.33). Der erste Gipfel enthielt seiner Aminosäurezusammensetzung nach Rechromatographie an QAE-Sephadex (Bedingungen wie Abb.31) zufolge (Tab. 34) ungespaltenes 61-Reste-Peptid neben Material, das durch die Abspaltung von B-CB-I-T-III-1 und -T-III-2 entstanden war. Die Zusammensetzung des zweiten Gipfels deutete auf ein Peptid mit ca. 16 Aminosäuren, das mit B-CB-I-T-III-1 bezeichnet wurde. Es enthielt außer Homoserinlacton auch einen Lysinrest, so daß es durch eine für Trypsin atypische Spaltung im C-terminalen Bereich des Peptids B-CB-I-T-I zustande gekommen sein mußte.

Das Pentapeptid B-CB-I-T-III-2 ließ durch seinen Homoserinlactongehalt bei fehlendem Gehalt an Lysin darauf schließen, daß es

Tab.34 Aminosäurezusammensetzung der Fraktionen der Abb.33
(Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül)

Aminosäuren	Hauptgipfel	B-CB-I -T-I	B-CB-I-T-III-1		B-CB-I-T-III-2	
				Reste ganzz.		Reste ganzz.
Asp	5,09	6	2,04	2	0,11	
Thr	4,12	5	1,37	1	1,01	1
Ser	3,25	4	1,23	1	1,00	1
Glu/Hse	11,28	12	2,11	2	1,05	1
Pro	5,97	6	1,30	1	0,02	
Gly	4,18	4	0,62	0-1	0,07	
Ala	1,99	3	1,97	2	0,05	
CM-Cys	2,42	3	1,01	1	0,01	
Val	2,26	3	1,00	1	0,94	1
Met	<0,01	(1)	0,01	(1)	<0,01	(1)
Ile	2,02	2	0,13		0,06	
Leu	5,73	6	0,72	1	0,05	
Tyr	<0,01	0	0,09		0,02	
Phe	2,97	3	0,26		0,07	
Lys	0,56	1	1,01	1	0,06	
His	0,43	1	0,87	1	0,01	
Hsl	0,10		0,55		0,73	
Arg	<0,01		<0,01		<0,01	
Trp		1				
Summe		61		15-16		5

durch die Spaltung der schwer angreifbaren Lysylbindung entstanden war, die sich demzufolge fünf Positionen vor dem C-Terminus von B-CB-I befinden mußte.

Das Ausmaß dieser beiden Spaltungen belief sich der erhaltenen

Menge von jeweils 0,08 μ Mol B-CB-I-T-III-1 und -T-III-2 zufolge auf etwa ein Drittel der eingesetzten Menge von 0,24 μ Mol des Peptids B-CB-I-T-I.

6. Trypsinspaltung des aminoäthylierten Peptids B-CB-I

Nachdem das 61-Reste-Peptid B-CB-I-T-I (CM) außer der schwer spaltbaren Lysylbindung keine weiteren tryptischen Angriffstellen mehr enthielt, blieben als Möglichkeiten für eine weitere Fragmentierung die Verwendung anderer Spaltmethoden oder die Rückkehr zur Aminoäthylierung, um die drei Cysteinreste des Peptids für die Spaltung mit Trypsin zugänglich zu machen. Da anzunehmen war, daß die tryptische Spaltung der Aminoäthylcysteinreste am ehesten zu überschaubaren Ergebnissen führen würde, griffen wir an dieser Stelle die Modifikation reduzierten Kallikreins mit Äthylenimin wieder auf.

Dabei ergaben sich jedoch aus den bisherigen Ergebnissen nicht vorhersehbare Probleme. Die Präparation von aminoäthyliertem Peptid B-CB-I verlief zwar bis einschließlich der Gelfiltration des Bromcyanspaltansatzes wie oben beschrieben, d.h. völlig analog der Darstellung von carboxymethyliertem Bromcyanpeptid B-CB-I, jedoch lieferte die Rechromatographie des aminoäthylierten 76-Reste-Peptids unter ähnlichen Bedingungen wie Abb.20 ein völli-

lig differierendes Bild (Abb.34). Es ergab sich dabei eine Auftrennung des Materials in mehrere Gipfel, die ihrerseits einem breiten flachen Peak aufgesetzt waren. Chromatographisch einheitliches Peptid B-CB-I (AE) mit einer plausiblen Aminosäurezusammensetzung konnte nur aus dem ersten Gipfel (um Fraktion 42) mit einer 15 - 20 %igen Ausbeute gewonnen werden. Dieses Elutionsdiagramm der Rechromatographie aminoäthylierten Peptids B-CB-I war in mehreren Präparationen reproduzierbar.

Da es für den Verlauf der Bromcyanspaltung unwesentlich sein sollte, ob die Alkylierung der Cysteinreste durch die Carboxymethyl- oder die Aminoäthylgruppe erfolgt war, lag es nahe, den Grund für die chromatographische Heterogenität ausschließlich des aminoäthylierten B-CB-I bereits in den Bedingungen der Aminoäthylierung zu suchen. Zur näheren Untersuchung des Sachverhaltes wurde Kallikrein unter den gleichen Bedingungen wie in Kap. III reduziert und aminoäthyliert. Das Reaktionsgemisch wurde gründlich gegen 0,1 M NH_4HCO_3 , pH 9 dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die Auftrennung des Ansatzes durch Gelfiltration über Sephadex G-75 in 50 %iger Essigsäure ergab ein Elutionsdiagramm analog Abb.6.

Anschließend wurde die aminoäthylierte B-Kette im System HAC 50 %, 0,05 M NaOH an SP-Sephadex mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,75 M NaCl rechromatographiert. Wie schon bei der Chromatographie des aminoäthylierten Bromcyanpeptids B-CB-I ergab sich dabei statt eines scharfen Peaks ein

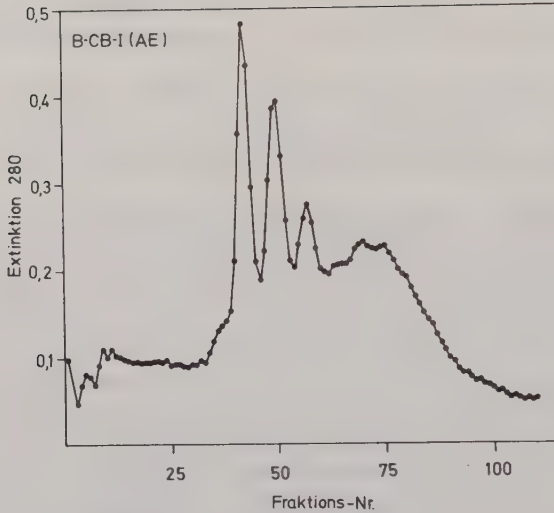


Abb.34 Rechromatographie des aminoäthylierten Bromcyanpeptids B-CB-I an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in HAc 50 %, 0,05 M NaOH. Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 300 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 11 ml/h und die Fraktionsgröße 2,16 ml.

breiter Gipfel, der sich über mehr als 50 Fraktionen erstreckte.

Als Ursache für diese starke chromatographische Heterogenität schon der aminoäthylierten B-Kette wurden zusätzliche Reaktionen mit dem in hohem Überschuß verwendeten Alkylierungsmittel vermutet. Deshalb wurde in einem weiteren Ansatz Kallikrein nach reduktiver Spaltung der Disulfidbrücken mit einer wesentlich geringeren Menge Äthylenimin umgesetzt (1,25facher Überschuß über Mercaptoäthanol). Das Reaktionsgemisch wurde wie oben dialysiert, lyophilisiert und durch Gelfiltration über Sephadex G-75 in HAc 50 % aufgetrennt. Statt der erwarteten zwei ergaben sich drei vergleichbar hohe Peaks. Ihr Elutionsverhalten ließ darauf schließen, daß es sich beim Material der ersten Fraktion um weitgehend unverändertes Kallikrein, beim Material der zweiten Fraktion um B-Kette und bei jenem der dritten Fraktion um A-Kette (gemeinsam mit C-Material) handelte. Das Material der B-Kette wurde unter den gleichen Bedingungen, wie sie nach Verwendung des 8fachen Äthyleniminüberschusses benutzt wurden, an SP-Sephadex chromatographiert. Hierbei ergab sich statt des breiten Gipfels im obigen Versuch ein scharfer symmetrischer Peak, der sich über nur ca. 10 Fraktionen erstreckte. Seine Aminosäurezusammensetzung entsprach einheitlicher B-Kette. Jedoch wurden statt 4,27 Resten Aminoäthylcystein, wie sie früher aufgefunden worden waren (vgl. Spalte 1 der Tab.9), in dem so isolierten Material 6,0 Reste dieser Aminosäure bestimmt, während der Gehalt an CM-Cys

6,95 Reste betragen hatte (Spalte 3 der Tab.9). Der niedrigere Wert von Aminoäthylcystein in den früheren Präparationen dürfte folglich auch mit der chromatographischen Heterogenität dieses Materials in Verbindung stehen. Da jedoch die Reduktion und Alkylierung des Kallikreins unter Verwendung eines 1,25fachen Äthyleniminüberschusses nur zu einer unvollständig verlaufenden Auftrennung geführt hatte, wurde derart isolierte chromatographisch einheitliche B-Kette noch nicht zur weiteren Spaltung eingesetzt. Statt dessen ist gegenwärtig die Arbeit zur Verbesserung der Ausbeuten des schonenden Verfahrens in Gang.

Wenn auch in niedrigen Ausbeuten, so war doch im ersten Gipfel der Rechromatographie des aminoäthylierten Bromcyanpeptids B-CB-I (Abb.34) Material isoliert worden, dessen Aminosäurezusammensetzung (Tab.35) auf hohe Reinheit (einschließlich des Gehaltes an AE-Cys) schließen ließ. Durch Vereinigung mehrerer Präparationen dieses Materials wurden ca. 0,7 μMol (E_{280}) chromatographisch reinen Peptids B-CB-I (AE) gewonnen.

Dieses Material wurde mit Trypsin behandelt und der Spaltansatz nach Zugabe von SBI durch Gelfiltration über Sephadex G-50 aufgetrennt (Abb.35). Bei einer Wellenlänge von 220 nm gemessen, wies das Elutionsdiagramm sieben Gipfel auf, von denen die ersten drei auch bei 280 nm aufzufinden waren.

Zur Unterscheidung von den Peptiden aus der tryptischen Spaltung des carboxymethylierten Bromcyanpeptids B-CB-I wurden die einzelnen Fraktionen mit arabischen Ziffern durchnummeriert und als Kenn-

Tab.35 Aminosäurezusammensetzung von aminoäthyliertem Bromcyanpeptid B-CB-I nach Rechromatographie an SP-Sephadex (erster Gipfel der Abb.34)
(Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül)

Aminosäuren		B-CB-I (CM)	
		Reste ganzz.	
Asp	7,04	7	7
Thr	5,95	6	6
Ser	5,16	5	5
Glu/Hse	13,43	13	13
Pro	7,04	7	7
Gly	4,07	4	4
Ala	4,97	5	5
Cys/2	3,00	3	3
Val	3,87	4	4
Met	<0,02	(1)	(1)
Ile	2,85	3	3
Leu	8,86	9	9
Tyr	0,04	0	0
Phe	3,02	3	3
Lys	3,02	3	3
His	0,98	1	1
Hsl	0,37		
Arg	0,93	1	1
Trp		(1)	1

zeichnung aminoäthylierten Materials jeweils (AE) hinzugefügt.

Der erste Gipfel wies einen verhältnismäßig hohen Gehalt an Cystin, Tyrosin und Methionin auf. Da alle drei Aminosäuren im Ausgangsmaterial B-CB-I (Tab.35) nicht enthalten sind, dürfte

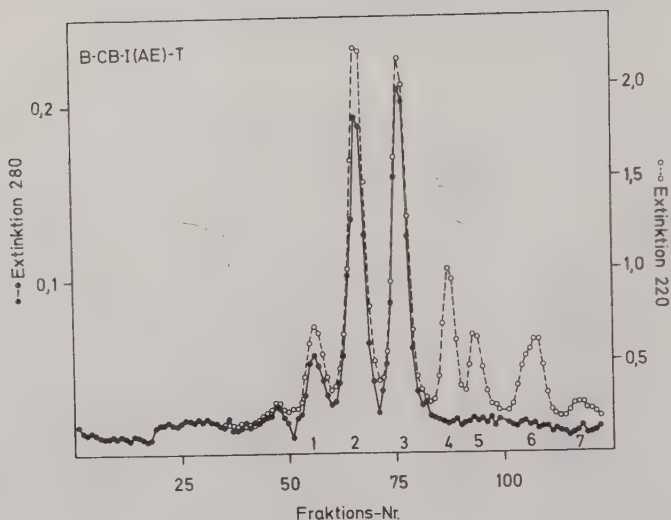


Abb.35 Gelfiltration des tryptischen Spaltansatzes von 0,7 μ Mol B-CB-I(AE) an Sephadex G-50 fine (140 x 1,5 cm) in 0,1 M NH_4HCO_3 pH 8,5

Die Elutionsgeschwindigkeit betrug ca. 10 ml /h und die Fraktionsgröße 1,65 ml.

es sich dabei um Trypsin und SBI neben Resten ungespaltenen Ausgangsmaterials handeln. Die Aminosäurezusammensetzungen der Gipfel B-CB-I-T-2(AE) bis -T-7(AE) sind in Tab.36 zusammengestellt.

B-CB-I-T-2(AE) erwies sich demzufolge als verhältnismäßig reines Peptid mit 46 Aminosäuren, B-CB-I-T-3(AE) als ein solches mit 34 Aminosäuren. Die Peptide B-CB-I-T-4(AE) und -T-5(AE) enthalten 15 bzw. 12 Aminosäurereste. Auf Material von geringer Molekülgröße ließ das Elutionsverhalten von B-CB-I-T-6(AE) schließen, obwohl der Aminosäureanalyse zufolge zunächst ebenfalls an ein Peptid mit 12 Aminosäuren zu denken war. Ein Vergleich der Zusammensetzung dieses Materials mit jener der beiden Peptide B-CB-I-T-II-1 und -T-II-2, die bei der tryptischen Spaltung carboxymethylierter B-Kette isoliert worden waren, zeigte, daß diese beiden Hexapeptide in der Fraktion B-CB-I-T-6(AE) enthalten sein mußten. Das argininhaltige Tripeptid B-CB-I-T-II-3 erwies sich als identisch mit dem Material der Fraktion B-CB-I-T-7(AE).

Da das 46-Reste-Peptid B-CB-I-T-2(AE) neben Homoserinlacton zwei Aminoäthylcysteinreste aufwies, mußte es zwei ungespaltene Aminoäthylcysteinylbindungen enthalten. Die Summe der Aminosäurereste des 34-Reste-Peptids B-CB-I-T-3(AE) und des 12-Reste-Peptids B-CB-I-T-5(AE) ergänzten sich vollständig zu der Zusammensetzung des 46-Reste-Peptids. Weiterhin enthielt das 34-Reste-Peptid zwar ebenfalls zwei Aminoäthylcysteinreste, jedoch kein Homose-

Tab. 36

Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide des aminoäthylierten Bromcyanpeptids B-CB-I
(Ein-Säulen-System; Reste pro Molekül; alle nicht aufgeführten Werte liegen unter einem Gehalt von 0,04 Resten)

Aminosäuren	B-CB-I -T-2(AE)	B-CB-I -T-3(AE)	B-CB-I -T-4(AE)	B-CB-I -T-5(AE)	B-CB-I -T-6(AE)	B-CB-I -T-7(AE)
Asp	5,92	3,98	0,05	1,86	1,04	1
Thr	2,98	1,91	1,93	1,06	0,90	1
Ser	3,15	2,07	1,04	1,10	1,08	1
Glu/Hse	8,51	6,94	3,92	2,12	1,06	1
Pro	3,93	3,15	2,02	1,18	1,07	1
Gly	3,05	2,99	1,01	0,11	0,07	1
Ala	2,92	1,02	1,89	1,89	1,90	2
AE-Cys	1,86	1,74	1,05	0,23	0,93	1
Val	1,99	1,01	0,98	1,03	0,93	1
Met	(1)			(1)		
Ile	1,98	1,97		0,09	0,91	1
Leu	3,11	2,96	3	0,33	1,06	1
Tyr			2,92		0,04	1,85 2
Phe	2,94	2,94	3			
Lys	0,93					
His	0,92					
Hsl	0,31					
Arg						
Trp	1,12 ^a	1,14 ^a		1,03	2,13	1,07 1
	1	1		0,90	0,04	
Summe	46	34	15	12	2x6	3

^a aus E₂₈₀

rinlacton. Somit war anzunehmen, daß B-CB-I-T-3(AE) und -T-5(AE) zwei Bruchstücke des Peptids B-CB-I-T-2(AE) darstellten, die durch Spaltung einer AE-Cys Bindung entstanden waren. Das 12-Reste-Peptid B-CB-I-T-5(AE) zeigte durch seinen fehlenden Gehalt an Aminoäthylcystein, daß es den C-Terminus von B-CB-I-T-2(AE) und damit denjenigen des Bromcyanpeptids B-CB-I darstellen mußte. Der fehlende Gehalt an Homoserinlacton bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung war in diesem Fall durch die Behandlung des HCl-Hydrolysates mit 0,05 M NaOH zur Entfernung restlichen NH_4HCO_3 vor der Aminosäureanalyse verursacht worden. Bei einer weiteren Präparation dieses Peptids (Tab.37) bestätigte der Gehalt an Homoserinlacton die Zuordnung als C-Terminus des Bromcyanpeptids B-CB-I.

Zusammenfassend ergab sich also aus der tryptischen Spaltung des aminoäthylierten Bromcyanpeptids B-CB-I folgendes Bild: Neben den beiden Hexapeptiden und dem Tripeptid, die bereits bei der tryptischen Spaltung von carboxymethyliertem B-CB-I erhalten worden waren, fand sich ein 46-Reste-Peptid (B-CB-I-T-2(AE)) und ein 15-Reste-Peptid (B-CB-I-T-4(AE)). Die Zusammensetzung der Summe dieser beiden Peptide entsprach genau derjenigen des C-terminalen 61-Reste-Peptids B-CB-I-T-I, das nach der tryptischen Spaltung carboxymethylierten B-CB-I erhalten worden war. Weiterhin wurde das 46-Reste-Peptid durch teilweise Spaltung einer Aminoäthylcysteinylbindung in ein N-terminales 34-Reste-Peptid

(B-CB-I-T-3(AE)) und ein C-terminales 12-Reste-Peptid (B-CB-I-T-5(AE)) aufgetrennt.

Die Summe der Aminosäurebausteine des 34-Reste-, des 15-Reste-, des 12-Reste- und des 3-Reste-Peptids sowie der beiden 6-Reste-Peptide entsprach vollständig jener des 76-Reste-Bromcyanpeptids B-CB-I. Damit zeigte sich, daß die tryptischen Fragmente des 76-Reste-Peptids lückenlos isoliert worden waren.

Mit je 0,21 μ Mol B-CB-I-T-2(AE) und -T-3(AE) sowie 0,25 μ Mol B-CB-I-T-5(AE) mußte die Spaltung des 46-Reste-Peptids in seine beiden Bruchstücke in einem Ausmaß von ungefähr 50 % erfolgt sein. Die beiden Hexapeptide wurden mit je 0,38 μ Mol in ca. 55 %, das Tripeptid mit 0,25 μ Mol in ca. 35 % der eingesetzten Menge von 0,7 μ Mol B-CB-I (AE) aufgefunden. Die Ausbeute des 15-Reste-Peptids B-CB-I-T-4(AE) betrug mit 0,39 μ Mol ebenfalls ca. 55 %.

Um die Ausbeute an CB-I-T-3(AE) und -T-5(AE) zu steigern, wurde B-CB-I-T-2(AE) weiter mit Trypsin gespalten. Durch Gelfiltration des Spaltansatzes unter den Bedingungen der Abb.35 konnten beide erwarteten Bruchstücke in analogen Elutionspositionen erhalten werden. Ihre Aminosäurezusammensetzung (Tab.37) entsprach ebenfalls unseren Erwartungen. Von insgesamt 0,18 μ Mol eingesetztem Peptid B-CB-I-T-2(AE) wurden 33 nmol (ca.25 %) als 34-Reste-Peptid und 45 nmol (ca.25 %) als 12-Reste-Peptid aufgefunden. Somit war die Nachspaltung des 46-Reste-Peptids unter präparativen Gesichtspunkten kaum lohnend.

Tab.37 Aminosäurezusammensetzung der beiden Fragmente der tryptischen Nachspaltung des Peptids B-CB-I-T-2 (AE)

(Ein-Säulen-Methode; Reste pro Molekül)

Amino- säuren	B-CB-I-T-3(AE)		B-CB-I-T-5(AE)		B-CB-I-T-2(AE)
Asp	3,91	4	2,07	2	6
Thr	1,80	2	0,92	1	3
Ser	2,15	2	1,13	1	3
Glu/Hse	6,83	7	1,43	1	8
Pro	2,85	3	0,83	1	4
Gly	3,07	3	0,08	0	3
Ala	1,01	1	1,99	2	3
AE-Cys	1,67	2	0,37	0	2
Val	0,99	1	0,98	1	2
Met				(1)	(1)
Ile	1,99	2	0,07	0	2
Leu	3,00	3	0,06	0	3
Tyr	0,01	0	0,02	0	0
Phe	2,92	3	0,05	0	3
Lys	0,03	0	1,01	1	1
His	0,01	0	1,01	1	1
Hsl			0,30		
Arg	0,01	0	0,01	0	0
Trp		(1)		0	1
Summe		34		12	46

6. Sequenz der B-Kette (Schema 2)

Die Einordnung der beiden Bromcyanpeptide B-CB-IV-1 und B-CB-I in die Gesamtsequenz der B-Kette konnte zunächst mit Hilfe der Ergebnisse der tryptischen Spaltung aminoäthylierter und maleylierter B-Kette durchgeführt werden. Bei dieser Spaltung war das N-terminale 14-Reste-Peptid B(AE,mal)-T-II erhalten worden. Da dieses Peptid einen der vier Methioninreste der B-Kette enthielt (Tab.25), mußte bei der Bromcyanspaltung ein Peptid mit höchstens 13 Aminosäureresten entstanden sein. Dabei konnte es sich nur um eines der beiden Bromcyanpeptide B-CB-IV-1 oder B-CB-IV-2 handeln. Ein Vergleich der Aminosäurezusammensetzung dieser beiden Peptide (Tab.38) mit jener von B(AE,mal)-T-II zeigte, daß das 11-Reste-Peptid B-CB-IV-1 das N-terminale Bromcyanfragment der B-Kette bilden mußte.

Nachdem B(AE,mal)-T-II durch eine argininspezifische Spaltung freigesetzt worden war, mußte sich der einzige Argininrest der B-Kette in der Position (14) befinden. Da das Peptid B-CB-I als einziges Bromcyanfragment einen Gehalt an Arginin aufwies, war zwingend anzunehmen, daß dieser Argininrest mit Arg(14) identisch war. Somit mußte das 76-Reste-Peptid B-CB-I innerhalb der Sequenz der B-Kette unmittelbar auf B-CB-IV-1 folgen und die Positionen (12) bis Met(87) einnehmen. Da B(AE,mal)-T-II zwei Leucinreste und einen Argininrest mehr enthielt als das Peptid B-CB-IV-1, konnte die Sequenz der drei N-terminalen Reste von B-CB-I nur

Leu(12)-Leu(13)-Arg(14) lauten.

Das vollständige Fehlen von Homoserinlacton wies das 39-Reste-Bromcyanpeptid B-CB-II (vgl.Tab.38) eindeutig dem C-Terminus der B-Kette zu. Es mußte demzufolge die Positionen (114) bis (152) umfassen. Somit blieb für die Placierung der beiden restlichen Bromcyanfragmente B-CB-IV-2 und B-CB-IV-3 nur noch die Lücke zwischen Met(87) und dem Rest (114). Die Isolierung des 26-Reste-Peptids B-CB-III (Tab.31) hatte bereits gezeigt, daß das 12-Reste-Peptid B-CB-IV-2 und das 14-Reste-Peptid B-CB-IV-3 unmittelbar verbunden sein mußten. Daraus ergab sich eine Bestätigung der Zuordnung beider Peptide zu benachbarten Positionen.

Über die Abfolge der beiden Peptide innerhalb der Sequenz der B-Kette sollte der Vergleich der aminoterminalen Teilsequenzen der beiden Bromcyanpeptide mit der Sequenz einiger aminoterminaler Reste des aus beiden Peptiden zusammengesetzten Peptids B-CB-III Aufschluß geben. Überraschenderweise fand sich jedoch ein völlig anderer Zugang zur Beantwortung dieser Frage. Beim automatischen Edman-Abbau des B-Ketten-Bruchstücks D-1 (vgl. Kap.III.5) ergab sich die folgende N-terminale Sequenz: Val-Thr-Glu-Ser-Met-Leu-Cys-Ala-Gly-Tyr-Leu-Pro-Gly-Gly-Lys-Asp-Thr-Cys-Met. Nachdem die Sequenzen der beiden Bromcyanpeptide B-CB-IV-2 und B-CB-IV-3 mittlerweile vollständig aufgeklärt waren, zeigte sich, daß die Sequenz des 14-Reste-Bromcyanpeptids B-CB-IV-3 vollständig mit der Sequenz beginnend bei Leucin in der 6. bis Methionin in der 19. Position von D-1 übereinstimmte. Da das Peptid B-CB-IV-2 weder

Val noch Thr noch Glu enthält (Tab.38), konnten die fünf aminoterminalen Reste von D-1 nicht in dem Peptid B-CB-IV-2 enthalten sein. Da B-CB-IV-2 jedoch , wie bereits erläutert, unmittelbar mit B-CB-IV-3 verknüpft sein mußte, konnte es somit nur eine Position C-terminal von B-CB-IV-3 einnehmen. Da den beiden Bromcyanpeptiden die Positionen (88) bis (113) der B-Ketten-Sequenz zugeordnet werden konnten, mußte B-CB-IV-3 folglich die Reste (88) bis (101), B-CB-IV-2 die Reste (102) bis (113) der B-Kette beinhalten. Die Sequenz des B-Ketten-Fragments D-1 stellt also eine Überlappung zwischen den beiden Bromcyanpeptiden B-CB-I und B-CB-IV-3 her, die mit Val(83) der B-Ketten-Sequenz beginnt. Der Methioninrest in der 5. Position von D-1 entspricht somit dem Met(87) der B-Ketten-Sequenz (Schema 2), das den C-Terminus des Bromcyanpeptids B-CB-I bildet.

Die Einordnung der erhaltenen fünf Bromcyanpeptide in die Sequenz der B-Kette konnte somit eindeutig festgelegt werden. Die Summe der Aminosäurebausteine dieser fünf Bromcyanpeptide entsprach bis auf einen jeweils zusätzlich aufgefundenen Rest an Isoleucin und Leucin der Aminosäurezusammensetzung der B-Kette (vgl. Tab.9 und 38).

Durch Abbau im Edman-Sequenator wurde die Sequenzanalyse unmittelbar an carboxymethylierter B-Kette bis Gln(33) möglich (Schema 2). Aus der Sequenz dieser 33 N-terminalen Reste ließ sich die Zuordnung der beiden Bromcyanpeptide B-CB-IV-1 und B-CB-I bestätigen.

Bei der Aufklärung der Sequenz des 12-Reste-Peptids B-CB-IV-2 durch den automatischen Edman-Abbau blieb bislang eine Unklarheit bestehen. Es ließ sich nicht entscheiden, ob es sich bei dem Rest (111) um Asp oder um Asn handelte. Da jedoch bereits bei der Beschreibung der Isolierung des Peptids B-CB-IV-2 mehrfach auf ein vermutliches Deamidierungsprodukt dieses Bromcyanfragmentes hingewiesen wurde, ist anzunehmen, daß es sich bei dem Rest (111) um Asparagin handelt.

Auf Grund seines fehlenden Gehaltes an Homoserinlacton war das 39-Reste-Peptid B-CB-II dem C-Terminus der B-Kette zugeordnet worden. Der automatische Edman-Abbau erlaubte eine eindeutige Identifizierung von 28 N-terminalen Resten dieses Peptids. Der Abschluß der Sequenzaufklärung von B-CB-II wurde durch die Sequenzierung des tryptischen Peptids B-CB-II-T-1 ermöglicht.

Bei der Spaltung des 39-Reste-Peptids mit Trypsin waren statt der drei Peptide, die auf Grund eines Gehaltes von zwei Lysinresten zu erwarten gewesen waren, nur zwei tryptische Fragmente erhalten worden. Die Erklärung dafür fand sich in der durch Trypsin nicht angreifbaren (62) Sequenz Lys(130)-Pro(131). Nachdem die Aminosäurezusammensetzung der 23 N-terminalen Reste von B-CB-II derjenigen des tryptischen Peptids B-CB-II-T-2 entsprach, mußte dieses 23-Reste-Peptid den N-Terminus, das 16-Reste-Peptid B-CB-II-T-1 hingegen den C-Terminus von B-CB-II bilden, wie es bereits der Gehalt von zwei Lysinresten in B-CB-II-T-2 und das

Fehlen dieser Aminosäure in B-CB-II-T-1 (Tab.32) hatte erwarten lassen. Die Identität der Sequenz der fünf N-terminalen Reste von B-CB-II-T-1 mit den Positionen (137) bis (141), die an ungespaltenem B-CB-II sequenziert worden waren, bildete eine weitere Bestätigung für diese Zuordnung.

Der automatische Edman-Abbau von B-CB-II-T-1 konnte bis zur C-terminalen Aminosäure dieses Peptids durchgeführt werden, die sich als Prolin erwies. Da Prolin nach der Hydrazinolyse als einzige Carboxylendgruppe der B-Kette aufgefunden worden war (Tab. 6), ergab sich aus diesem Befund eine zusätzliche Bestätigung für die Richtigkeit der Zuordnung von B-CB-II-T-1 zum C-Terminus der B-Kette.

Im Verlaufe der Sequenzierung von B-CB-II-T-1 traten jedoch zwei Leerstellen auf. Es gelang nicht, die zu den Positionen 145 und 146 gehörigen Aminosäuren zu fassen und zu identifizieren. Ein Vergleich der Aminosäurezusammensetzung dieses Peptids (Tab.32) mit den Ergebnissen der Sequenzanalyse ergab jedoch, daß für die Auffüllung dieser Lücke nur jener verbleibende Gehalt von ca. 1,5 Resten Asx in Betracht kam, dessen mangelnde Ganzzahligkeit bereits öfter erwähnt wurde. Somit war anzunehmen, daß es sich bei den Positionen 145 und 146 jeweils um einen Asx Rest handelt. Der Gehalt des Peptids B-CB-II-T-1 an dieser Aminosäure wurde demzufolge von 3,5 auf vier Reste aufgerundet.

Auffälligerweise trat diese Schwierigkeit bei der Bestimmung der Aminosäuresequenz und der Aminosäurezusammensetzung gerade in je-

nem Peptid auf, das den gesamten Kohlehydratanteil der B-Kette enthalten sollte (s.o.). Vermutlich liegt der Polysaccharidanteil auch der B-Kette wie unter IV.3 erläutert über Glucosamin an die Amidgruppe einer Asparaginkette gebunden vor. Als charakteristische Sequenz kommt innerhalb von B-CB-II-T-1 hierfür nur (Asn)(145)-(Asn)(146)-Thr(147) in Betracht, so daß Asn(145) die Carbohydratbindungsstelle der B-Kette darstellen dürfte.

Nach der tryptischen Spaltung des carboxymethylierten Bromcyanpeptids B-CB-I waren zunächst vier Peptide isoliert worden (vgl. Tab.39). Durch seinen Gehalt an Homoserinlacton erwies sich das 61-Reste-Peptid B-CB-I-T-I als C-terminal. Es mußte demzufolge die Reste (27) bis (87) der B-Kette umfassen. Da der einzige Argininrest der B-Kette in der Position (14) aufgefunden wurde, mußte das argininhaltige Tripeptid B-CB-I-T-II-3 die Reste (12) bis (14) beinhalten. Seine Aminosäurezusammensetzung entsprach erwartungsgemäß der Differenz der Aminosäurebausteine der beiden Peptide B(AE,mal)-T-II und B-CB-IV-1. Somit blieben für die Zuordnung der beiden lysinhaltigen Hexapeptide B-CB-I-T-II-1 und -T-II-2 nur noch die zwölf Aminosäurepositionen (15) bis (26) der B-Kette. Eine Aussage über ihre Reihenfolge ermöglichte erst der Vergleich ihrer Aminosäurezusammensetzung (vgl. Tab.39) mit der unmittelbar an der B-Kette bis Gln 33 aufgeklärten Sequenz. B-CB-I-T-II-2 mußte demzufolge Leu(15) bis Lys(20) und B-CB-I-T-II-1 Ile(21) bis Lys(26) entsprechen. Die Summe der Aminosäure-

bausteine der aus B-CB-I isolierten vier tryptischen Peptide ermöglichte eine endgültige Festlegung der Aminosäurezusammensetzung des Bromcyanpeptids B-CB-I. Außer im Falle von Leucin stimmte der Gehalt von B-CB-I an jeder einzelnen Aminosäure mit der Summe des Gehalts dieser Aminosäure in den tryptischen Fragmenten überein (Tab.28 und 39). Als Summe des Leucingehaltes der vier tryptischen Peptide ergaben sich jedoch neun Reste, so daß der Wert von 8,33 Resten (Tab.28) auf neun Reste aufgerundet wurde. Das Bromcyanpeptid B-CB-I mußte demzufolge aus 76 Aminosäuren bestehen.

Die intensivere tryptische Weiterspaltung des 61-Reste-Peptids B-CB-I-T-I, das noch eine unversehrte Lysylbindung enthalten hatte, führte zur Isolierung der beiden Peptide B-CB-I-T-III-1 und B-CB-I-T-III-2 (Tab.34). Das 15 bis 16 Aminosäuren enthaltende Peptid B-CB-I-T-III-1 wies neben Homoserinlacton noch einen Lysinrest auf. Deshalb mußte es durch eine für Trypsin atypische Spaltaktivität zustande gekommen sein und den Positionen (72 oder 73) bis (87) der B-Kette entsprechen.

Das Pentapeptid B-CB-I-T-III-2 schließlich enthielt kein Lysin mehr. Deshalb war zu vermuten, daß es durch die tryptische Spaltung der restlichen Lysylbindung des Peptids B-CB-I-T-I entstanden war. Da dieses Peptid eine erhebliche Menge an Homoserinlacton aufwies, mußte es den C-Terminus von B-CB-I-T-I (und somit von B-CB-I) bilden, d.h. die Reste (83) bis (87) der B-Kette beinhalten.

Wie bereits erläutert, wurde der N-Terminus des B-Ketten Fragmentes D-1 der Position Val(83) der B-Kette zugeordnet. Eine weitere Bestätigung dieser Einordnung von D-1 in die Sequenz der B-Kette liegt in der Übereinstimmung der Aminosäurezusammensetzung der fünf N-terminalen Reste von D-1 mit jener des Pentapeptids B-CB-I-T-III-2, dessen N-Terminus ebenfalls der Rest (83) sein sollte.

Wenn dieses Peptid wie anzunehmen durch eine für Trypsin charakteristische Aktivität freigesetzt worden war, mußte sich der schwer angreifbare Lysinrest des Peptids B-CB-I-T-I folglich in der Position (82) befinden. Diese Annahme wurde durch die N-terminale Sequenz Lys-Val-Thr des B-Ketten-Fragmentes D-2 gestützt. Wie bereits beschrieben (Kap.III.5), handelt es sich beim Material D-2 um N-terminal um einen Lysinrest verlängertes Fragment D-1. Da der N-terminale Valinrest von D-1 die Position 83 der B-Kettensequenz einnimmt, muß sich demzufolge das N-terminale Lysin von D-2 in der Position (82) befinden, in der entsprechend der Isolierung von B-CB-I-T-III-2 bereits ein Lysinrest vermutet worden war.

Die bei der tryptischen Spaltung des aminoäthylierten Bromcyanpeptids B-CB-I entstandenen Peptide sind in der Tab.40 zusammengestellt. Die Spaltung an Arg(14), Lys(20) und Lys(26) sollte unabhängig vom Typ der Modifikation der Cysteinreste verlaufen sein. Da keines der drei Peptide B-CB-I-T-II-(1bis3), die nach der Spaltung des carboxymethylierten Bromcyanpeptids B-CB-I isoliert

Tab.38 Übersicht über die Zusammensetzung der Bromcyanpeptide der B-Kette (vgl. Tab.28, 29, 30, 39 und 40)

Positionen	1-152 B-Kette	1-11 B-CB- IV-1	12-87 B-CB-I	88-101 B-CB- IV-3	102-113 B-CB- IV-2	114-152 B-CB-II
Amino- säuren						
Asp	18	3	7	1	2	5
Thr	12		6	1		5
Ser	10	1	5		1	3
Glu	15		13			2
Pro	12		7	1	1	3
Gly	15	1	4	3	4	3
Ala	8	1	5	1		1
Cys/2	7		3	2	1	1
Val	4		4			
Met	4	1	1	1	1	
Ile	9		3		1	5
Leu	15	1	9	2	1	2
Tyr	4	1		1		2
Phe	4		3			1
Lys	7	1	3	1		2
His	3	1	1			1
Arg	1		1			
Trp	4		1			3
Summe	152	11	76	14	12	39
Ausbeuten	a	45	75	35	35	100
in %	b	40	40	25	25	85

a Ausbeuten nach Gelfiltration (Abb.18)
b Gesamtausbeuten nach Weiterreinigung

Tab.39 Übersicht über die isolierten tryptischen Peptide des carboxymethylierten Bromcyanpeptids B-CB-I (vgl.Tab. 33, 34 und 38)

Positionen	12-87 B-CB-I	12-14 B-CB-I- T-II-3	15-20 B-CB-I- T-II-2	21-26 B-CB-I- T-II-1	27-87 B-CB-I- T-I
Amino- säuren					
Asp	7			1	6
Thr	6			1	5
Ser	5		1		4
Glu	13		1		12
Pro	7		1		6
Gly	4				4
Ala	5		1	1	3
Cys/2	3				3
Val	4			1	3
Met	1				1
Ile	3			1	2
Leu	9	2	1		6
Tyr	0				
Phe	3				3
Lys	3		1	1	1
His	1				1
Arg	1	1			
Trp	1				1
Summe	76	3	6	6	61
Ausbeuten in %		100	90	90	75

worden waren, CM-Cys enthielt, mußten die gleichen drei Peptide bei der tryptischen Spaltung von aminoäthyliertem B-CB-I wiederum anfallen. Die beiden Hexapeptide wurden in der Fraktion B-CB-I-T-6(AE) und das Tripeptid in der Fraktion B-CB-I-T-7(AE) aufgefunden.

Das 46-Reste-Peptid B-CB-I-T-2(AE) mußte dem Homoserinlactongehalt zufolge den C-Terminus von B-CB-I bilden und somit die Positionen (42) bis (87) einnehmen. Zwischen den Resten (27) und (42) blieb also eine Lücke von 15 Aminosäuren, die durch ein entsprechendes Peptid ausgefüllt sein mußte. Der Aminosäurezusammensetzung zufolge (vgl. Tab.40) konnte es sich bei diesem Peptid nur um das 15-Reste-Peptid B-CB-I-T-4(AE) handeln, das demnach durch tryptische Spaltung an Lys(26) und AE-Cys(41) freigesetzt worden sein mußte. Die Summe der Aminosäurebausteine des Tripeptids, der beiden Hexapeptide, des 15-Reste-Peptids und des 46-Reste-Peptids stimmt genau überein mit der Aminosäurezusammensetzung des 76-Reste-Peptids B-CB-I (vgl. Tab.40).

Das 46-Reste-Peptid B-CB-I-T-2(AE) mußte durch einen nur unvollständigen tryptischen Angriff an Aminoäthylcystein in das 34-Reste-Peptid B-CB-I-T-3(AE) und das 12-Reste-Peptid B-CB-I-T-5(AE) gespalten worden sein. Der fehlende Gehalt an Aminoäthylcystein sowie der Homoserinlactongehalt wiesen das 12-Reste-Peptid dem C-Terminus von B-CB-I und somit den Positionen (76) bis (87) zu. Das 34-Reste-Peptid mußte demzufolge die Positionen (42) bis AE-Cys(75) einnehmen. Mit zwei Aminoäthylcysteinresten ent-

hielt B-CB-I-T-3(AE) offensichtlich noch immer eine durch Trypsin nur schwer angreifbare Aminoäthylcysteinylbindung. Die Summe der Aminosäurebausteine des 34-Reste- und des 12-Reste-Peptids ergänzte sich lückenlos zu der Aminosäurezusammensetzung des 46-Reste-Peptids B-CB-I-T-2(AE) (vgl. Tab.40).

Die bislang bei der Ermittlung der Sequenz des Kallikreins verbliebene Lücke umfaßt die 48 Aminosäurereste zwischen Gln(33) und Lys(82) der B-Kette. Mit Hilfe der noch durchzuführenden Sequenatoranalyse jener Peptide, die bei der tryptischen Spaltung des aminoäthylierten Bromcyanpeptids B-CB-I erhalten wurden, sollte es möglich sein, die Aufklärung der Sequenz des Kallikreins abzuschließen.

Tab.40 Übersicht über die tryptischen Peptide von B-CB-I(AE) (vgl. Tab.33,36 und 37)

Positionen	12-87 B-CB-I	12-14 B-CB-I- T-II-3	15-20 B-CB-I- T-II-2	21-26 B-CB-I- T-II-1	27-41 B-CB-I- T-4(AE)	42-75 B-CB-I- T-3(AE)	76-87 B-CB-I- T-5(AE)	42-87 B-CB-I- T-2(AE)
Amino- säuren								
Asp	7			1		4	2	6
Thr	6			1	2	2	1	3
Ser	5		1		1	2	1	3
Glu	13		1		4	7	1	8
Pro	7		1		2	3	1	4
Gly	4				1	3	1	3
Ala	5		1	1		1	2	3
AE-Cys	3				1	2		2
Val	4			1	1	1	1	1
Met	1							
Ile	3							
Leu	9	2	1	1	3	2		2
Tyr						3		3
Phe	3							
Lys	3		1	1		3	1	3
His	1						1	1
Arg	1	1					1	1
Trp	1							
Summe	76	3	6	6	15	34	12	46
Ausbeuten in %		35	55	55	55	30	35	30

Schema 2 Sequenz der B-Kette (2. Teil; sequenzierte Bereiche)

(D-1) 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107
Leu-Cys-Ala-Gly-Tyr-Leu-Pro-Gly-Gly-Lys-Asp-Thr-Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro
_____ B-CB-IV-3 _____ B-CB-IV-2

108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127

Leu-Ile-Cys-Asx-Gly-Met-Trp-Gln-Gly-Ile-Thr-Ser-Trp-Gly-His-Pro-Thr-Cys-Gly-Ser-

—————

—————

————— B-CB-II-T-2 ———

128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147
Ala-Asn-Lys-Pro-Ser-Ile-Tyr-Thr-Lys-Leu-Ile-Phe-Tyr-Leu-Asp-Trp-Ile(Asx,Asx)Thr-
==B-CB-II==
==B-CB-II-T-1==

1148 149 150 151 152
Ile-Thr-Glu-Asn-Pro

VI. Experimenteller Teil

1. Modifikationsreaktionen

Reduktion und Aminoäthylisierung (63,64)

Pro 1 ml 6 N Guanidin/HCl (p.a., Serva), 0,01 % EDTA, 0,25 M Tris/HCl, pH 8,6, wurden 10 bis 15 mg Kallikrein gelöst. Unter N_2 wurden pro ml 25 μ l (0,35 mMol) 2-Mercaptoäthanol (reinst, Serva) zugegeben. Nach 12 - 18 h Inkubation unter N_2 bei 25°C wurden in drei gleichen Portionen im Abstand von 10 min je 50 μ l (0,97 mMol) Äthylenimin (monomer, puriss., Fluka) pro ml zugefügt (Überschuß Äthylenimin über Mercaptoäthanol ca. 8-fach). Anschließend wurde die Probe durch Gelfiltration über Sephadex G-75 (0,1 M NH_4HCO_3 , pH 9) aufgetrennt.

Reduktion und Carboxymethylierung (63,65)

Die Reduktion der Disulfidbrücken des Kallikreins erfolgte wie bei der Aminoäthylisierung mit Ausnahme der Verwendung von 1,0 M statt 0,25 M Tris/HCl. Nach der Inkubation mit Mercaptoäthanol wurden unter N_2 pro ml 65,9 mg (0,35 mMol) Jodessigsäure (p.a., Merck; frisch umkristallisiert aus Petroläther (66), Sdp. 40 - 60°C) in 0,26 ml 1,4 N NaOH zugegeben. Nach 15 min wurde die Re-

aktion durch Zugabe von 10 - 20 μ l Mercaptoäthanol pro ml beendet. Die Auftrennung erfolgte über Sephadex G-75 (0,1 M NH_4HCO_3 , pH 7).

Maleylierung (67)

Zu ca. 10 - 20 mg aminoäthylierter A- bzw. B-Kette in ca. 1 ml 6 N Guanidin/HCl wurden in mehreren Portionen 50 mg Maleinsäureanhydrid (Schuchardt) gegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde dabei am pH-Staton (Radiometer-Autotitrator) mit 4 M NaOH konstant auf 8,0 gehalten. Nach beendeter Zugabe von Maleinsäureanhydrid wurde der Ansatz gegen 1 mM NaHCO_3 , pH 8,0 dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Nach erfolgter tryptischer Spaltung wurden die Aminogruppen durch Inkubation des Spaltansatzes in 50 %iger Essigsäure (24 h, 37°C) deacyliert.

2. Chromatographische Trennungen

Die Bedingungen für Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie sind jeweils in der Legende zu den einzelnen Abbildungen angegeben. Die Gradienten für die Ionenaustauschchromatographie wurden mit Hilfe einer Mehrkanalschlauchpumpe erzeugt. Die Extinktion jeder einzelnen Fraktion des Eluates wurde durch Messung am Zeiss Spektralphotometer PMQ II bestimmt. Die Fraktionen wurden

wie in den Abb. angezeigt vereinigt.

Soweit möglich wurden flüchtige Puffer verwendet. 0,1 M NH_4HCO_3 wurde durch Gefriertrocknung entfernt. Proben, die in 50 %iger Essigsäure isoliert worden waren, wurden bei ca. 37°C im Wasserstrahlvakuum zur Trockne einrotiert. Triäthylammoniumacetat (59) ließ sich sowohl aus verdünnter wässriger Lösung als auch aus Puffern mit 50 %iger Essigsäure durch weitgehendes Einrotieren im Wasserstrahlvakuum bei ca. 37°C und anschließendes Evakuieren der Probe bei 37°C auf ca. 10^{-1} Torr unter Kühlung der Vorlage mit Methanol/Trockeneis entfernen.

Ninhydrinreaktion (68,69)

Zunächst (Abb.10) wurde zu den getrockneten Proben jeweils 1,0 ml 3 N NaOH gegeben und 1 h am siedenden Wasserbad hydrolysiert. Nach Neutralisation mit 1,0 ml 30 %iger Essigsäure wurde 1,0 ml Ninhydrinreagenz (2 g Ninhydrin und 0,6 g Hydrindantin gelöst in 150 ml Äthylenglycolmonomethyläther/50 ml 4 M Natriumacetat, pH 5,51) zugegeben und die Lösung 15 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Zusatz von 5 ml 50 %igem Äthanol wurde die Extinktion bei 570 nm gemessen.

Da der Materialbedarf dieser Methode im Verhältnis zu den zur Verfügung stehenden Probemengen zu groß war, wurde der Maßstab um den Faktor 10 herabgesetzt (alle Ninhydrindetektionen außer Abb. 10). Dazu wurden die Proben jeweils in Eppendorf-Reaktionsgefäße

überführt und bei 110°C im Trockenschrank getrocknet. Die anschließende Hydrolyse erfolgte durch 60 min Inkubation der Proben in 100 µl 3 N NaOH im verschlossenen Eppendorf-Reaktionsgefäß mit fixiertem Deckel bei 110°C. Nach Neutralisation des Hydrolysates mit 200 µl 15 %iger Essigsäure wurden 100 µl Ninhydrinreagenz zugegeben und die Probe im wiederum verschlossenen Eppendorf-Reaktionsgefäß 15 min auf 110°C erhitzt. Vor der Extinktionsmessung bei 570 nm wurde die Probe mit 0,5 ml 50 %igem Äthanol verdünnt.

3. Elektrophoretische Methoden

SDS-Elektrophoresen (70)

Elektrophoresen in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen wurden in einem Gerät der Firma Shandon in 5 x 75 mm Röhrchen durchgeführt. Die Gele bestanden aus 12,5 % Acrylamid, 1,25 % N,N'-Methylenbisacrylamid und enthielten 8 M Harnstoff. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 10 mg Ammoniumpersulfat und 10 µl TEMED zu je 25 ml Gellösung bewirkt. Als Puffer in Gelen und Elektrodenräumen fand 0,1 M Tris/H₃PO₄, pH 6,8, 0,1 % SDS Verwendung. Zwischen 5 und 50 µg Probe wurden in einem Volumen zwischen 5 und 100 µl 0,01 M Tris/H₃PO₄, pH 6,8, 8 M Harnstoff, 1 % SDS auf das Trenngel aufgesetzt. Bei Bedarf wurden als Reduktionsmittel

zur Probelösung 1 % Dithioerythrit (Abb.2, Gel 5) oder 1 % Mercaptoäthanol (Abb.4, Gel 1) zugesetzt und die Lösung unmittelbar vor dem Aufsetzen 30 min bei 37°C inkubiert. Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25 % in 10 % HAc, 50 % Methanol). Die Entfärbung wurde in 7,5 % HAc, 25 % Methanol durchgeführt und die Gele in 1 % HAc aufbewahrt. Sämtliche zur SDS-Elektrophorese verwendeten Reagentien: Serva, p.a. oder reinst.

Disk-Elektrophorese (71)

Zur Disk-Elektrophorese (Abb.5) wurden ebenfalls 12,5 %ige Polyacrylamidgele, vernetzt mit 1,25 % N,N'-Methylenbisacrylamid, verwendet. Sie enthielten gleichfalls 8 M Harnstoff. Als Gelpuffer wurde 0,04 M Tris/HCl, pH 8,9, als Elektrodenpuffer 5 mM Tris/Glycin, pH 8,3 benutzt. Die Proben (ca. 20 µg) wurden in 50 µl Sephadex G-200-Suspension (8 M Harnstoff, 5 mM Tris/H₃PO₄, pH 6,9) auf das Trenngel aufgebracht. Apparatur, An- und Entfärbung wie bei der SDS-Elektrophorese.

Dünnschichtelektrophorese

Dünnschichtelektrophoresen wurden in einem Gerät der Firma Bender u. Hobein mit je ca. 10 µg Peptid auf Cellulosedünnschichtplatten (Merck, 10 x 20 cm, 0,1 mm Schichtdicke) bei pH 4,2 (0,4 % Pyridin, 0,8 % HAc) durchgeführt. Die Anfärbung erfolgte durch Be-

sprühen mit Ninhydrin/Cadmiumacetat-Lösung (100 mg Cadmiumacetat, 10 ml Wasser, 5 ml HAc, 100 ml Aceton, 1 g Ninhydrin) (72) und 15 min Erhitzen auf 110°C.

4. Endgruppenanalysen

Bestimmung der Aminoendgruppe nach der Dansylmethode (73)

Ca. 10 nmol Peptid wurden in 30 µl 0,05 M NaHCO₃, pH 8,3 gelöst. Dazu wurden 30 µl 10 mM Dansylchloridlösung (p.a., Serva) in Aceton gegeben. Nach 12 h Reaktion wurde die Probe über CaCl₂/P₂O₅ im Vakuum getrocknet und anschließend 4 bzw. 20 h bei 105°C mit 1:1 verdünnter HCl konz. hydrolysiert (evakuierte Ampulle). Das wiederum im Vakuum (P₂O₅, KOH) getrocknete Hydrolysat wurde in 50 µl Aceton/Eisessig 3:2 (V/V) aufgenommen und 1 µl davon zur Chromatographie auf eine Polyamidfolie (5 x 5 cm, Cheng Chin Trading Co., Taiwan) gebracht (74). Als Laufmittel diente in der 1. Dimension 1,5 %ige Ameisensäure, in der 2. Dimension Benzol/Eisessig 9:1. Zur Abtrennung des Alanins von Dansylamid wurde das Chromatogramm in der 2. Dimension und anschließend nochmals mit Essigsäureäthylester/Methanol/Eisessig 20:1:1 entwickelt (75). Die Identifizierung der Endgruppe erfolgte durch Cochromatographie mit der vermuteten Dansylaminosäure (p.a., Serva).

Bestimmung der Aminoendgruppen nach der Cyanatmethode (76)

Ca. 4 mg aminoäthylierte A- bzw. B-Kette wurden in 2 mM HCl gelöst, die Proben geteilt und getrocknet. Die eine Hälfte wurde durch Zusatz von 0,1 ml einer Lösung von 400 mg KNCN (Merck) in 5,2 ml 30 %igem N-Äthylmorpholin/HAc, pH 8,0 carbamylt. Die andere Hälfte wurde zur Bestimmung des Blindwertes mit 0,1 ml desselben Puffers behandelt, der jedoch statt KNCN KCl enthielt. In der Folge wurden die Blindwertproben genauso wie die carbamylt. Proben behandelt. Die Carbamylierungsreaktion wurde 5 h bei 50°C durchgeführt. Anschließend erfolgte durch 80 min Erhitzen der zwischendurch getrockneten Proben in 0,25 ml HAc, 50 %, 0,25 ml HCl konz. auf 100°C in der evakuierten Ampulle die Zyklisierung zu den entsprechenden Hydantoinen. Nachdem die Proben zur Trockne einrotiert worden waren, wurden sie in Wasser aufgenommen, Aliquots für die Aminosäureanalyse entnommen und schließlich durch Filtration über Dowex 50-X 2 (8 x 0,4 cm; 200 - 400 mesh) in Wasser die Hydantoine abgetrennt. Dabei wurde kein Versuch gemacht, die Hydantoine von Trp, His und Arg zu erfassen. Die Identifizierung der N-terminalen Aminosäuren erfolgte nach alkalischer Hydrolyse der Hydantoinderivate (0,2 N NaOH, 24 h, 110°C) in evakuierten Ampullen durch Aminosäureanalyse des neutralisierten und getrockneten Hydrolysats. Bei der Berechnung der Aminoendgruppen wurden die Blindwerte in Abzug gebracht.

Bestimmung der C-terminalen Endgruppen durch Hydrazinolyse (77)

Nach quantitativer Probenahme für Aminosäureanalysen wurde zu 0,5 - 1 mg getrockneter Probe jeweils 0,5 ml Hydrazin (wasserfrei, Pierce) zusammen mit ca. 10 mg entsprechend vorbehandeltem Amberlite CG 50 gegeben. Die Hydrazinolyse erfolgte in der evakuierten Ampulle bei 80°C für 48, 72 und 96 h. Nach Gefriertrocknung der Proben wurde das Hydrazinolysat unmittelbar zur Aminosäureanalyse eingesetzt.

5. Aminosäureanalysen

Zur HCl-Hydrolyse wurde Material mit 10 - 100 nmol von jeder der zu bestimmenden Aminosäuren mit 3 ml 6 N HCl (die nach (78) zur Verhinderung der Oxidation von Tyr 0,2 % Phenol enthielt) in evakuierten Ampullen (ca. 10^{-1} Torr) bei 110°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) i.a. 24 h hydrolysiert. Anschließend wurde die Salzsäure am Rotationsverdampfer bei ca. 37°C im Wasserstrahlvakuum entfernt.

Zur Bestimmung des Tryptophan- und Glucosamingehaltes wurden Hydrolysen von ca. 1 mg Protein in 2 ml 3 M p-Toluolsulfonsäure (p.a., Merck), der 0,2 % Tryptamin (puriss., Fluka) beigelegt waren, 24 h bei 110°C durchgeführt (79). Um das Hydrolysat zu neutralisieren, wurden 3 ml 1,33 N NaOH zugegeben und die Lösung mit Wasser auf 5,0 ml aufgefüllt. 1,0 ml dieser Lösung wurden zur

Aminosäureanalyse eingesetzt.

Die Aminosäureanalysen wurden teilweise nach der Zwei-Säulen-Methode von Spackman, Stein und Moore (80) mit einem Beckman Uni-chrom Aminosäureanalysator durchgeführt. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe des Integrators CRS-110A der Firma Infotronics.

In einem modifizierten Verfahren erfolgte am gleichen Gerät die Analyse aller Aminosäuren, auch der basischen, in einem einzigen Lauf an der langen Säule. Bei gleichem ersten Puffer wie im Zwei-Säulen-System wurde dazu 0,8 M Natriumcitrat, pH 4,10 als zweiter Puffer verwendet.

CM-Cys wurde in beiden Systemen unmittelbar vor Asp eluiert. AE-Cys wurde im Zwei-Säulen-System zwischen Lys und His, im Ein-Säulen-System vor Ammoniak, Lys und His eluiert.

Der Peak des Glucosamins erschien im Zwei-Säulen-System auf der langen Säule nach Phe, auf der kurzen Säule zwischen Phe und Trp. Bei der Ein-Säulen-Methode fiel der Glucosaminpeak mit den Peaks von Ile und/oder Leu zusammen, so daß in glucosaminhaltigen Proben alle drei Werte nicht zu erfassen waren.

Homoserin wurde in beiden Systemen gemeinsam mit Glu eluiert.

In quantitativ auszuwertenden Serien von Aminosäureanalysen wurden nach jeder 3. oder 4. Analyse Standard-Aminosäuregemische (Pierce, Biorad) eingesetzt. Ansonsten wurde für jede Aminosäure ein mittlerer Farbwert als Mittelwert aus 18 Analysen von Standardgemischen bestimmt.

Die Farbwerte nicht in kommerziellen Standardgemischen enthaltener Aminosäuren wurden wie folgt festgelegt: Für CM-Cys wurde der Farbwert zu 92,3 % desjenigen von Asp bestimmt, in guter Übereinstimmung mit 91,7 % nach (80).

Der Farbwert von AE-Cys wurde zu 89,4 % desjenigen von Lys bestimmt, während Hofmann (81) hierfür 92 % angibt.

Der Farbwert von Glucosamin wurde als 1,12- bzw. 1,08-faches desjenigen von Asp bzw. Ala bestimmt. Zur Berechnung wurde jeweils das Mittel aus beiden Werten verwendet.

Da Homoserin und Glu zusammen eluiert wurden, wurde für die Berechnung des Gehaltes dieses Peaks an beiden Aminosäuren ausschließlich der Farbwert von Glu verwendet.

Der Farbwert von Homoserinlacton wurde nach (81) zu 65 bzw. 57 % derjenigen von Leu bzw. Lys angenommen und zur Berechnung das Mittel aus beiden Werten verwendet.

Für Tryptophan wurde ein Farbwert von 66 % desjenigen von Lys ermittelt.

Nach den Ergebnissen kinetischer Untersuchungen in unserem Arbeitskreis (18) wurde zur Korrektur auf Zerstörung des Threonins bei der 24-h-HCl-Hydrolyse mit dem Faktor 1,039, zur Korrektur auf Zerstörung des Serins unter den gleichen Bedingungen mit dem Faktor 1,091 multipliziert. Die Werte beider Aminosäuren nach der Hydrolyse mit p-Toluolsulfonsäure und nach HCl-Hydrolysen längerer Dauer blieben unkorrigiert.

Die Glucosaminwerte nach 24-h-HCl-Hydrolyse mußten wegen stark

schwankenden Ausmaßes der Zerstörung unkorrigiert bleiben. Die Destruktion des Glucosamins bei der 24-h-Hydrolyse mit p-Toluolsulfonsäure wurde in unserem Arbeitskreis zu durchschnittlich 13,5 % bestimmt (18) und die erhaltenen Werte deshalb mit dem Korrekturfaktor 1,16 multipliziert.

6. Spektrophotometrische Bestimmung des Tryptophangehaltes

Außer durch Aminosäureanalysen von Toluolsulfonsäurehydrolysaten wurde der Tryptophangehalt von Peptiden durch die Extinktion des Materials bei 280 nm in Verbindung mit einer Proteinbestimmung durch Aminosäureanalyse ermittelt. Dazu wurden die von Edelhoch (82) angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten von Tryptophan und Tyrosin bei 280 nm verwendet. Bei der gleichzeitigen Bestimmung des Tryptophangehaltes durch beide voneinander unabhängige Methoden ergab sich eine Übereinstimmung der Resultate (z.B. Tab. 26).

7. Bestimmung des Proteingehaltes

Wo nicht anders angegeben, erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes durch quantitative Aminosäureanalysen. Gelegentlich wurde der Proteingehalt durch die Extinktion des Materials bei 280

nm bestimmt, wenn der Gehalt an Tyrosin und Tryptophan bereits bekannt war. Dazu wurden ebenfalls die von Edelhoch (82) angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten dieser beiden Aminosäuren verwendet. Diese Methode der Proteinbestimmung ist jeweils im Text durch den Zusatz (E_{280}) zur Mengenangabe gekennzeichnet.

8. Methoden zur Spaltung von Peptidbindungen

Bromcyanspaltung (46,83)

Die Bromcyanspaltung von Peptiden (10 - 20 mg/ml) wurde durch Inkubation des Materials in 50 mM oder 100 mM Bromcyanlösung (reinst, Serva) in 70 %iger Ameisensäure (84) für 24 oder 48 h durchgeführt. Anschließend wurde die Lösung 1:10 mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet.

Trypsinspaltungen

Die tryptischen Spaltungen wurden mit TPCK-behandeltem β -Trypsin (Rind) durchgeführt, das durch Chromatographie an SE-Sephadex von restlichen Verunreinigungen befreit worden war (85). Teils wurden die Spaltungen unter Konstanthaltung des pH-Wertes mit 5 mM NaOH am Radiometer-Autotitrator, teils in gepufferter Lösung durchgeführt.

Die Spaltung von 1,47 μ Mol aminoäthylierter, maleylierter A-Kette

(Kap. IV.1, Abb.10) erfolgte am Autotitrator durch Zugabe von 50 μ l einer 0,2 %igen Trypsinlösung zu ca. 2 ml Gesamtvolumen (pH 9,0, 25°C). Nach ca. 1 h war die NaOH-Aufnahme durch die Reaktion weitgehend beendet. Der NaOH-Verbrauch zur Konstanthaltung des pH-Wertes betrug 1,15 μ Mol. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer äquivalenten Menge Eisessig gestoppt.

1,09 μ Mol carboxymethylierte A-Kette (Kap. IV.2, Abb.11) wurden in ca. 2 ml Lösung am Autotitrator (pH 9, 25°C) mit 100 μ l 0,5 %iger Trypsinlösung gespalten. Nach 110 min war die Laugeaufnahme durch die Reaktion weitgehend beendet. Der Verbrauch an NaOH betrug 2,72 μ Mol. Trypsin wurde durch die Zugabe von 40 μ l 2 %iger SBI-Lösung inaktiviert.

Die tryptische Spaltung von 0,58 μ Mol aminoäthylierter, maleylierter B-Kette (Kap. V.1, Abb.17) wurde ebenfalls am Autotitrator in ca. 2 ml Lösung bei pH 9 und 25°C durchgeführt. Dazu wurden 20 μ l 0,2 %ige Trypsinlösung verwendet. Nach Ende der NaOH-Aufnahme wurden 20 μ l 0,4 %ige SBI-Lösung zugesetzt. Bei der Reaktion wurden zur Konstanthaltung des pH-Wertes 0,45 μ Mol NaOH verbraucht.

Zur Trypsinspaltung von 0,57 μ Mol des Bromcyanpeptids B-CB-II (Kap. V.4, Abb.28,29) am Autotitrator (ca. 2 ml, pH 9, 25°C) wurden 100 μ g Trypsin eingesetzt. Der Laugeverbrauch der Reaktion bis zum Stillstand betrug 1,2 μ Mol. Trypsin wurde durch Zugabe von 0,5 ml Eisessig inaktiviert.

Die Spaltung von 0,20 μ Mol des Bromcyanpeptids B-CB-I (Kap. V.5,

Abb.30) wurde am Autotitrator (ca. 1,5 ml, pH 8,5, 25°C) mit 50 µg Trypsin durchgeführt. Der Laugeverbrauch der Reaktion (Dauer ca. 1 h) betrug 0,35 µMol. Die Spaltung wurde durch Zugabe einer äquivalenten Menge Eisessig beendet.

Die Nachspaltung von 0,24 µMol des tryptischen Fragmentes B-CB-I-T-I (Kap.V.5, Abb.33) erfolgte in 0,6 ml 0,1 M NH_4HCO_3 , pH 8,5 mit 100 µg Trypsin, zugesetzt in zwei gleichen Portionen im Abstand von 12 h. Die Reaktion wurde bei 37°C 18 h durchgeführt. Anschließend wurden 0,6 ml Eisessig zugesetzt.

Die tryptische Spaltung von 0,7 µMol des aminoäthylierten Bromcyanpeptids B-CB-I(AE) (Kap. V.6, Abb.35) wurde in 2 ml 0,1 M NH_4HCO_3 , pH 8,5 durchgeführt. Dazu wurden 200 µg Trypsin in drei gleichen Portionen im Abstand von je 30 min zugesetzt. Nach 90 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µg SBI gestoppt.

Die tryptische Nachspaltung von 0,18 µMol B-CB-I-T-2(AE) (Kap. V.6) wurde in 1,0 ml 0,1 M NH_4HCO_3 , pH 8,5 bei 37°C durch Zusatz von 150 µg Trypsin bewirkt. Nach 4 h wurden 300 µg SBI zugegeben.

VII. Diskussion

1. Zur Methode der Aufklärung der Aminosäuresequenz

Bis in die jüngste Zeit wird zur Aufklärung von Proteinsequenzen eine vor allem von Sanger (86,87) und von Edman (88) entwickelte Methode verwendet. Sie beinhaltet die Fragmentierung einer Peptidkette, die Isolierung und Reinigung einer großen Anzahl verhältnismäßig kleiner Peptide und die Aufklärung der Aminosäuresequenz dieser Peptide bis zu maximal ca. 18 Resten durch manuellen Edmanabbau. Durch eine Wiederholung des gesamten Vorganges unter Verwendung einer oder mehrerer weiterer Spaltmethoden wird versucht, überlappende Bruchstücke zu gewinnen, die eine unzweideutige Anordnung der zunächst erhaltenen Peptidsequenzen entsprechend ihrer Reihenfolge im untersuchten Protein ermöglichen.

Die Einführung des automatisierten Edmanabbaus (42) ermöglichte eine wesentliche Ausdehnung dieses stufenweisen Prozesses in Ausnahmefällen bis hin zu 50 oder 60 Abbauschritten. Dadurch ergab sich eine neue Strategie bei der Aufklärung von Proteinsequenzen, die auch im Verlaufe der Untersuchungen an der Primärstruktur des Kallikreins Verwendung fand. Statt der Isolierung einer großen Anzahl kleiner Peptide wird angestrebt, verhältnismäßig wenige große Segmente zu erhalten. So erforderte z.B. beim Thermolysin die herkömmliche Methode der Sequenzermittlung die Isolierung und Struk-

turanalyse von 173 kleinen Peptiden (89), während bei einer Wiederholung der Sequenzanalyse dieses Proteins unter Verwendung der Sequenatoranalyse 60 % der Gesamtsequenz des Thermolysins in sechs große Peptide aufgeteilt erfaßt werden konnten (90). Die bei der Fragmentierung eines Proteins in wenige wohldefinierte und hochgereinigte Bruchstücke auftretenden Schwierigkeiten werden durch die Vorteile weit überwogen, die die rasche Aufklärung längerer Teilsequenzen durch den automatischen Edmanabbau mit sich bringen.

Bei der A-Kette des Kallikreins war neben der Bestimmung der N-terminalen Teilsequenz zur Ermittlung der Gesamtsequenz dieses 80 Aminosäurereste umfassenden Polypeptids nur noch der automatische Edmanabbau von drei weiteren Peptiden erforderlich. Die bisherigen Ergebnisse für die Sequenz der Kallikrein-B-Kette wurden außer aus der N-terminalen Teilsequenz durch die Sequenatoranalyse von insgesamt fünf Fragmenten gewonnen. Die Fertigstellung der Gesamtsequenz dieser Kette ist von der automatischen Sequenzanalyse von drei weiteren Peptiden zu erwarten, so daß für die Aufklärung der Aminosäuresequenz dieser 152 Reste umfassenden Polypeptidkette die N-terminale Teilsequenz und der automatische Edmanabbau von insgesamt 8 Fragmenten genügen dürften.

Wie am Beispiel der Aufklärung der Aminosäuresequenz des Schweine-trypsins (32) gezeigt wurde, besteht eine Möglichkeit der Gewinnung von sequenatorgerechten Peptiden in der aufeinanderfolgenden Anwendung einer ganzen Anzahl meist chemischer Spaltmethoden. In

Richtung vom N-Terminus auf den C-Terminus des Schweinetrypsins wurde dadurch eine Abfolge sich überlappender sequenatorgeeigneter Peptide isoliert, die eine stufenweise Sequenzierung des Gesamtmoleküls ermöglichten.

Im Gegensatz dazu war es im Verlaufe der Sequenzaufklärung des Kallikreins nicht erforderlich, Methoden zur Gewinnung überlappender Bruchstücke anzuwenden. Es gelang bei jeder durchgeführten Spaltung der Ketten des Enzyms, sämtliche auf Grund der Aminosäurezusammensetzung erwarteten Bruchstücke zu isolieren und ihrer Reihenfolge nach anzuordnen.

Schwer lösliche bzw. zur Aggregation neigende Peptide bereiten Schwierigkeiten bei der Reinigung, die sich in vielen Fällen durch Ionenaustauschchromatographie in 8 M harnstoffhaltigen Lösungen beseitigen lassen (91). In der vorliegenden Arbeit konnten in solch schwierigen Fällen durch Verwendung eines Systems der Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex in schwach gepufferter 50 %iger Essigsäure die Nachteile des Arbeitens mit 8 M harnstoffhaltigen Lösungen vermieden werden. Da das von uns verwendete Elutionsmittel am Rotationsverdampfer bis auf den verhältnismäßig geringen Gehalt an nicht flüchtigen Natriumsalzen entfernt werden kann, entfällt bei der Entsalzung die Handhabung solch großer Probenmengen, wie sie bei der Chromatographie in 8 M Harnstoff anfallen. Weiterhin wird in diesem System die Gefahr der Carbamylierung von Aminogruppen des Proteins durch den Cyanatgehalt der Harnstofflösungen vermieden. In verschiedenen Fällen konnten wir

durch Verwendung von Triäthylammonium- anstelle von Natriumionen ein flüchtiges Puffersystem einsetzen, das trotz seiner stark desaggregierenden Wirkung eine salzfreie Isolierung der gewonnenen Peptide unmittelbar nach der Chromatographie erlaubte.

Neben der Gewinnung sequenatorgerechter Peptide kommt der stufenweisen kontrollierten Fragmentierung des Kallikreinmoleküls in wohldefinierte Segmente eine weitere wichtige Bedeutung zu: Damit eröffnet sich die Möglichkeit, nach chemischer Modifikation einzelner Aminosäuren die entsprechenden Sequenzabschnitte verhältnismäßig einfach zu isolieren. Dies dürfte einen wesentlichen Beitrag zur Erleichterung zukünftiger Untersuchungen über Spezifität und Katalysemechanismus dieses Enzyms darstellen.

Im Verlaufe der bisherigen Untersuchungen konnte die Sequenz von 186 der 232 Aminosäuren des Kallikreins (entsprechend 80 % aller Reste) ermittelt werden. Die Vervollständigung der Aminosäuresequenz des Kallikreins ist in Kürze von der Sequenatoranalyse der restlichen drei noch nicht sequenzierten, jedoch isolierten, charakterisierten und zugeordneten Peptide zu erwarten.

2. Über die Homologie des Kallikreins mit anderen Serinproteasen

Allgemeine Bemerkungen

Dem Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Aminosäuresequenz von Kallikrein mit den Sequenzen einiger anderer Serinproteasen seien einige allgemeine Überlegungen vorangestellt.

Eine Vergleichsmöglichkeit liegt zunächst darin, unabhängig von der spezifischen Bedeutung einer bestimmten Aminosäureposition für die Struktur oder Funktion der betrachteten Proteine die allgemeine Wahrscheinlichkeit des Austausches einer bestimmten Aminosäure in dieser Position gegen eine andere bestimmte Aminosäure in derselben Position zu untersuchen. Dayhoff et al. (92) haben die Art und Zahl der einzelnen Aminosäureaustausche, die von der natürlichen Selektion akzeptiert wurden, innerhalb einer ganzen Anzahl von Proteinfamilien zusammengestellt. Dabei wurde von diesen Autoren das Maß für die Größe eines evolutionären Wechsels folgendermaßen definiert: Als 1 PAM (abgeleitet aus Accepted P-ooint Mutation) wurde eine einzige akzeptierte Mutation pro 100 Aminosäurereste eines Proteins bezeichnet. Wenn sich eine Proteinsequenz nur wenig verändert, dann ist die Zahl der beobachteten Punktmutationen gleich der Anzahl von PAM-Einheiten. Mit stärkerer Veränderung jedoch beginnen sich diese Punktmutationen zu überlagern. Das Maximum an beobachtbaren Aminosäureaustauschen kann pro 100 Reste die Zahl 100 nicht überschreiten; für die Anzahl von

PAM-Einheiten gibt es diese obere Grenze jedoch nicht. So können sich z.B. zwei Aminosäuresequenzen innerhalb von 100 Positionen in 50 Resten unterscheiden; um diese Anzahl von Differenzen hervorzubringen, mag jedoch tatsächlich ein Austausch von 83 Aminosäureresten stattgefunden haben, von denen sich 33 überlagerten. In diesem Beispiel beträgt die Evolutionsdistanz 83 PAM-Einheiten. Selbst bei der verhältnismäßig großen Evolutionsdistanz von 250 PAM-Einheiten bleiben im Mittel noch ca. 20 % aller Aminosäurepositionen unverändert (34).

Die innerhalb der einzelnen von diesen Autoren untersuchten Proteinfamilien resultierenden Matrices der akzeptierten Punktmutationen wurden zu einer Matrix zusammengefaßt (92), die nun die Austauschigenschaften der einzelnen Aminosäuren untereinander unabhängig von den untersuchten Proteinfamilien widerspiegelt. Neben einigen häufigen Austauschtypen und einer größeren Anzahl verhältnismäßig seltener Aminosäureaustausche fand sich dabei eine Anzahl von Aminosäurepaaren, zwischen denen bei den betrachteten Proteinfamilien niemals ein Austausch stattgefunden hat.

Mit Hilfe der verschiedenen ermittelten Austauschhäufigkeiten wurde eine Skala von relativen Mutabilitäten der einzelnen Aminosäuren aufgestellt. Dabei erwies sich Serin als die Aminosäure mit der höchsten, Tryptophan als jene mit der niedrigsten relativen Mutabilität. Aus der Kombination dieser relativen Mutabilitäten mit der Häufigkeit ganz bestimmter Austausche wurde die Wahrscheinlichkeit des Austausches jeder einzelnen Aminosäure gegen jede an-

dere Aminosäure in Form von Mutationswahrscheinlichkeitsmatrices zusammengestellt. Eine solche Mutationswahrscheinlichkeitsmatrix enthält Angaben, die vom zugrunde gelegten Entwicklungszeitraum abhängen. Da die Geschwindigkeit, mit der verschiedene Proteinfamilien Mutationen akzeptieren, jedoch äußerst unterschiedlich ist, kann die Zeitabhängigkeit der allgemeinen Mutationswahrscheinlichkeitsmatrix nicht im absoluten Zeitmaß, sondern nur unter Eliminierung der Annahmegeschwindigkeit von Punktmutationen in PAMs angegeben werden. So entspricht z.B. bei den Enzymen der Trypsin-Chymotrypsin-Familie ein Entwicklungszeitraum von 5 PAM-Einheiten einer Zeitspanne von ca. 100 Millionen Jahren, bei den sich besonders schnell verändernden Fibrinopeptiden jedoch nur einer solchen von ca. 5,5 Millionen Jahren und bei den sehr wenig variablen Histonen einem Zeitraum von ca. 8 Milliarden Jahren (93). In den rund 1,5 Milliarden Jahren, die seit der Auftrennung der Gene für Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Thrombin vergangen sind (34), hat sich zwischen diesen Enzymen eine Evolutionsdistanz von ungefähr 75 PAM-Einheiten herausgebildet.

In den Arbeiten von Dayhoff et al. (92) sind Mutationswahrscheinlichkeitsmatrices für die beiden Evolutionsdistanzen von 2 PAM- und von 256 PAM-Einheiten angegeben. Die Wahrscheinlichkeit des Austausches einer bestimmten Aminosäure gegen eine bestimmte andere Aminosäure ist naturgemäß in der kürzeren Evolutionsdistanz von 2 PAMs wesentlich geringer als in jener, die für 256 PAM-Einheiten errechnet wurde. Die Mutationswahrscheinlichkeitsmatrix

für 256 PAMs geht jedoch aus derjenigen für 2 PAMs durch Matrizenmultiplikation hervor, so daß sich die Verhältnisse der einzelnen Elemente der Matrix zueinander zwar zahlenmäßig, nicht jedoch prinzipiell ändern. Der Grenzwert einer unendlich oft wiederholten Matrizenmultiplikation führt zur Degeneration der enthaltenen Information in Richtung auf die mittlere Aminosäurezusammensetzung der untersuchten Proteinfamilien. Die Verhältnisse der einzelnen Matrixelemente zueinander sind somit in der 2 PAM-Matrix größer als in der 256 PAM-Matrix, die der Degeneration bereits wesentlich näher ist.

Nach Dayhoff et al. ist zwar im Prinzip für den Vergleich verwandter Aminosäuresequenzen eine Matrix im Bereich der diesen Proteinen entsprechenden Evolutionsdistanz am günstigsten, jedoch ergibt sich dabei ein breites Optimum (94), so daß aus praktischen Gründen im "Atlas of Protein Sequence and Structure 1972" (34) zur Abschätzung von Mutationswahrscheinlichkeiten allgemein die 256 PAM-Matrix verwendet wird. Dementsprechend findet auch in der vorliegenden Arbeit die 256 PAM-Matrix dafür Verwendung.

Aus der verschiedenen Mutabilität der einzelnen Aminosäuren ergeben sich zwei wesentliche Eigenschaften der einzelnen Elemente der Matrix: So ist die Wahrscheinlichkeit eines Austausches der Aminosäure X gegen die Aminosäure Y keineswegs gleich der Wahrscheinlichkeit eines Y/X Austausches; die Wahrscheinlichkeit, daß ein Paar identischer Aminosäuren X/X in zwei verwandten Sequenzen ei-

ner Mutation unterliegt, kann größer, gleich oder kleiner als die Wahrscheinlichkeit sein, daß das Paar X/X im Verlaufe der Evolution erhalten bleibt.

Mit Hilfe der Division der einzelnen Elemente der Mutationswahrscheinlichkeitsmatrix für 256 PAMs durch die normalisierten Frequenzen der Aminosäuren in der Matrix der akzeptierten Punktmutationen ergibt sich die "odds matrix" (92). Die einzelnen Elemente dieser Matrix geben die Relation von zwei Wahrscheinlichkeiten wieder: Die Wahrscheinlichkeit, daß in zwei verwandten Aminosäuresequenzen ein bestimmtes Aminosäurepaar auf Grund einer gemeinsamen Vorläufersequenz zustande kam im Verhältnis zu der Wahrscheinlichkeit, daß die entsprechende Konstellation der beiden Aminosäuren durch bloßen Zufall auftrat. Somit ermöglichte die "odds matrix" Angaben über das Ausmaß verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen zwei Proteinsequenzen in einer bestimmten Position. Soweit entsprechende Angaben in der vorliegenden Arbeit gemacht sind, beruhen sie auf dieser "odds matrix" nach (92).

Eine wichtige Rolle für die Wahrscheinlichkeit, daß irgendwann in der Entwicklung zweier verwandter Proteine eine bestimmte Aminosäure gegen irgendeine andere Aminosäure ausgetauscht wird, spielt die Anzahl der Nucleotide eines Tripletcodons, die für diese Veränderung mutiert werden müssen. Durch Untersuchungen an abnormalen Hämoglobinen ließ sich die Vermutung bestätigen, daß Aminosäureaustausche, die nur der Mutation einer einzigen Base eines

Tripletcodons bedürfen, zunächst bei weitem am häufigsten auftreten (95). Wenn die natürliche Auslese im weiteren Schicksal dieser Mutanten keine wesentliche Rolle spielte, wären praktisch nur solche Einbasenmutationen zu erwarten. Für die natürliche Selektion ist jedoch nicht die Wahrscheinlichkeit einer Nucleotidmutation von Bedeutung, sondern die chemischen Eigenschaften der resultierenden Aminosäure. So finden sich durch Überlagerung von Mutationswahrscheinlichkeit und Selektionsdruck im allgemeinen jene Aminosäureaustausche am häufigsten, die nur die Veränderung eines Nucleotids erfordern und dabei zum Ersatz einer Aminosäure durch eine chemisch ähnliche Aminosäure führen. (konservativer Austausch).

Um die homologen Teilsequenzen zweier oder mehrerer Proteine einander optimal zuordnen zu können, ist die Einführung von Lücken (gaps) in einzelne Sequenzbereiche nötig. Das Auftreten eines solchen "Lückenereignisses" (gap event) in einander zugeordneten Sequenzen spiegelt einen wichtigen Typ von genetischen Ereignissen in der Entwicklungsgeschichte der entsprechenden Proteine wieder: 1. Die Insertion oder die Deletion von Nucleotidtriplets in die den jeweiligen Genen entsprechenden DNA-Bereiche und 2. die Annahme eines solchen verlängerten oder verkürzten Gens durch die natürliche Auslese. Die Wahrscheinlichkeit von Deletionen oder Insertionen ist wesentlich geringer als jene von Aminosäureaustauschen (96). Im Mittel der verglichenen Proteine traf auf 42 Aminosäureaustausche eine Deletion oder Insertion

einer mittleren Länge von 1,8 Resten. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Deletionen oder Insertionen dürfte sich ebenfalls innerhalb einzelner Proteinfamilien stark unterscheiden. Am ehesten sind solche wohl zu erwarten, wenn nach einer Genduplikation die Tochtergene sich in Richtung auf Proteinprodukte entwickeln, die unterschiedliche funktionelle Charakteristiken aufweisen (96).

Für die Wahrscheinlichkeit des Austausches einer bestimmten Aminosäure gegen eine andere Aminosäure ist häufig die spezifische Rolle dieser Aminosäure für die Aufrechterhaltung der Struktur und der Funktion einer Gruppe homologer Proteine von Bedeutung. Die Wahrscheinlichkeit, daß Aminosäuren, die über ihre Rolle bei der Faltung der Polypeptidkette hinaus eine besondere Funktion bei der Aufrechterhaltung gemeinsamer Merkmale innerhalb einer Proteinfamilie besitzen, einem Austausch unterliegen, ist wesentlich geringer als die durchschnittliche Mutationswahrscheinlichkeit. So ist zwar die relative Mutabilität des Serins die höchste aller Aminosäuren, jede Mutation des Serinrestes 195 jedoch, der für die Familie der Serinproteasen namensgebend ist, dürfte wegen des damit verbundenen Verlustes der enzymatischen Aktivität im Verlaufe der Entwicklung durch die natürliche Selektion zurückgewiesen worden sein. Je nach dem Grade der Wichtigkeit einer bestimmten Sequenzposition für die spezifische Struktur und Funktion einer Proteingruppe dürfte sich demzufolge zwischen der vollständigen Invariabilität und der statistischen Variabilität

eine ganze Skala von Abstufungen erstrecken.

Zuordnung der Sequenz des Kallikreins

Die bisher aufgeklärte Aminosäuresequenz des Kallikreins ist in Schema 3 mit den Sequenzen einiger anderer Pankreasserinproteasen (bzw. derer Zymogene) sowie der Aminosäuresequenz der B-Kette des Thrombins, dem in der Leber synthetisierten Vertreter einer Gruppe von Serinproteasen mit Funktionen im komplexen Vorgang der Blutgerinnung und Fibrinolyse, verglichen.

Während in der vorliegenden Arbeit bislang zur Bezifferung der einzelnen Aminosäurereste ihre jeweilige Position innerhalb der A- bzw. der B-Kette Verwendung fand, folgt die Bezifferung der Aminosäurepositionen in Schema 3 und den weiteren Erläuterungen der Numerierung der Reste des Chymotrypsinogens A. Um Verwechslungen beider Kennzeichnungssysteme auszuschließen, wurde in den bisherigen Kapiteln die Bezifferung der einzelnen Aminosäurereste in Klammern gesetzt. In Schema 3 unterstrichene Nummern entsprechen in der Tertiärstruktur des Chymotrypsins (97) internen Positionen.

Die Sequenz der vier N-terminalen Reste der A-Kette des Kallikreins zeigt ausgeprägte Ähnlichkeit mit den N-terminalen Sequenzen (Pos. 16-19) der zum Vergleich herangezogenen anderen Serinprote-

31 32 33 34 35 36 36A 36B 36C 37 38 39 40 41 41A 41B 41C 41D
 K (S) Val-Ala-Ile-Tyr-----His-Tyr-Ser-Ser-Phe-Gln-
 T (S) Val-Ser-Leu-Asn-----Ser-Gly-Ser-His-Phe-----
 T (R) Val-Ser-Leu-Asn-----Ser-Gly-Tyr-His-Phe-----
 T (H) Val-Ser-Leu-Asn-----Val-Gly-Tyr-His-Phe-----
 CA (R) Val-Ser-Leu-Gln-Asp-Lys-----Thr-Gly-Phe-His-Phe-----
 CB (R) Val-Ser-Leu-Gln-Asp-Ser-----Thr-Gly-Phe-His-Phe-----
 E (S) Ile-Ser-Leu-Gln-Tyr-Arg-Ser-Gly-Ser-Ser-Trp-Ala-His-Thr-----
 Th (R) Val-Met-Leu-----Phe-Arg-Lys-----Ser-Pro-Gln-Glu-Leu-Leu-----

42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59
 K (S) Cys-Gly-Gly-Val-Leu-Val-Asn-Pro-Lys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Lys-
 T (S) Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Asn-Ser-Gln-Trp-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Tyr-
 T (R) Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Asn-Ser-Gln-Trp-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Tyr-
 T (H) Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Ala-Pro-Gly-Trp-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Tyr-
 CA (R) Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Asn-Glu-Asn-Trp-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Gly-
 CB (R) Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Ser-Glu-Asp-Trp-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Gly-
 E (S) Cys-Gly-Gly-Thr-Leu-Ile-Arg-Gln-Asn-Trp-Val-Met-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Val-
 Th (R) Cys-Gly-Ala-Ser-Leu-Ile-Ser-Asp-Arg-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Leu-

K (S)	60	61	62	63	64	65	65A	66	66A	66B	66C	66D	66E	66F	66G	66H	66I	66K		
	Asn	Asp	Asn	Tyr	Glu	Val	Gly	Trp												
T (S)	Lys	Ser	Arg	Ile	Gln	Val	Arg	Leu												
T (R)	Lys	Ser	Gly	Ile	Gln	Val	Arg	Leu												
T (H)	Gln	Arg	Arg	Ile	Gln	Val	Arg	Leu												
CA (R)	Val	Thr	Thr	Ser	Asp	Val		Val												
CB (R)	Val	Thr	Thr	Ser	Asp	Val		Val												
E (S)	Asp	Arg	Glu	Leu	Thr	Phe	Arg	Val												
Th (R)	Leu	Tyr	Pro	(Trp, Pro, Asx, Lys, Asx, Phe)	Thr	Val	Asx	Asx	Leu	Leu	(Ser, Val, Val,									
K (S)	66L	66M	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82		
					Leu	Arg	His	Asn	Leu	Phe	Glu	Asn	Glu	Asn	Thr	Ala	Gln	Phe		
T (S)					Gly	Glu	His	Asn	Ile	Asp	Val	Leu	Glu	Gly	Asn	Glu	Gln	Phe		
T (R)					Gly	Gln	Asp	Asn	Ile	Asn	Val	Val	Glu	Gly	Asn	Gln	Gln	Phe		
T (H)					Gly	Glu	His	Asp	Ile	Ser	Ala	Asn	Glu	Gly	Asp	Glu	Thr	Tyr		
CA (R)					Val	Ala	Gly	Glu	Phe	Asp	Gln	Gly	Ser	Ser	Ser	Glu	Lys	Ile	Gln	Lys
CB (R)					Val	Ala	Gly	Glu	Phe	Asp	Gln	Gly	Leu	Glu	Thr	Glu	Asp	Thr	Gln	Val
E (S)					Val	Val	Gly	Glu	His	Asn	Leu	Asn	Gln	Asn	Gly	Thr	Glu	Gln	Tyr	
Th (R)					Glx, Trp)	Arg, Ile	Gly	Lys, His	Ser	Arg	Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Lys	Val	Glu	Lys	

83 84 84A 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 95A 95B 95Y 95Z
 K (S) Phe-Gly-----Val-Thr-Ala-Asp-Phe-Pro-His-Pro-Gly-Phe-Asn-Leu-Ser/Ala-Asp-
 T (S) Ile-Asn-----Ala-Ala-Lys-Ile-Ile-Thr-His-Pro-Asn-Phe-Asn-----
 T (R) Ile-Ser-----Ala-Ser-Lys-Ser-Ile-Val-His-Pro-Ser-Tyr-Asn-----
 T (H) Ile-Asp-----Ser-Ser-Met-Val-Ile-Arg-His-Pro-Asn-Tyr-Ser-----
 CA (R) Leu-Lys-----Ile-Ala-Lys-Val-Phe-Lys-Asn-Ser-Lys-Tyr-Asn-----
 CB (R) Leu-Lys-----Ile-Gly-Lys-Val-Phe-Lys-Asn-Pro-Lys-Phe-Ser-----
 E (S) Val-Gly-----Val-Gln-Lys-Ile-Val-Val-His-Pro-Tyr-Trp-Asn-----
 Th (R) Ile-Ser-Met-Leu-Asp-Lys-Ile-Tyr-Ile-His-Pro-Arg-Tyr-Asn-----

96 97 98 99 99A 99B 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111
 K (S) Gly-Lys-Asp-Tyr-----Ser-His-Asp-Leu-Met-Leu-Leu-Arg-Leu-Gln-Ser-Pro-
 T (S) Gly-Asn-Thr-Leu-----Asp-Asn-Asp-Ile-Met-Leu-Ile-Lys-Leu-Ser-Ser-Pro-
 T (R) Ser-Asn-Thr-Leu-----Asn-Asn-Asp-Ile-Met-Leu-Ile-Lys-Leu-Lys-Ser-Ala-
 T (H) Gly-Tyr-Asp-Leu-----Asp-Asn-Asp-Ile-Met-Leu-Ile-Lys-Leu-Ser-Lys-Pro-
 CA (R) Ser-Leu-Thr-Ile-----Asn-Asn-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys-Leu-Ser-Thr-Ala-
 CB (R) Ile-Leu-Thr-Val-----Arg-Asn-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr-Pro-
 E (S) Thr-Asp-Asp-Val-Ala-Ala-Gly-Tyr-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Arg-Leu-Ala-Gln-Ser-
 Th (R) Trp-Lys-Glu-----Asn-Leu-Asp-Arg-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Arg-Pro-

K (S)	112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129	Ala-Lys-Ile-Thr-Aso-Ala-Val-Lys-Val-Leu-Glu-Leu-Pro-Thr-----Gln(Pro,Leu,
T (S)		Ala-Thr-Leu-Asn-Ser-Arg-Val-Ala-Thr-Val-Ser-Leu-Pro-Arg-----Ser-Cys-Ala-
T (R)		Ala-Ser-Leu-Asn-Ser-Arg-Val-Ala-Ser-Ile-Ser-Leu-Pro-Thr-----Ser-Cys-Ala-
T (H)		Ala-Ala-Leu-Asn-Arg-Asn-Val-Asp-Leu-Ile-Ser-Leu-Pro-Thr-----Gly-Cys-Ala-
CA (R)		Ala-Ser-Phe-Ser-Gln-Thr-Val-Ser-Ala-Val-Cys-Leu-Pro-Ser-Ala-Ser-Asp-Asp-
CB (R)		Ala-Gln-Phe-Ser-Glu-Thr-Val-Ser-Ala-Val-Cys-Leu-Pro-Ser-Ala-Asp-Glu-Asp-
E (S)		Val-Thr-Leu-Asn-Ser-Tyr-Val-Gln-Leu-Gly-Val-Leu-Pro-Arg-Ala-Ser-Thr-Ile-
Th (R)		Ile-Glu-Leu-Ser-Asp-Tyr-Ile-His-Pro-Val-Cys-Leu-Pro-Lys,Ala-Ser-Thr-Arg,
K (S)	130 131 131A132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145	Ser, Glx,Gly,Thr,Glx)Cys(Leu,Ile,Thr,Gly,Trp,Gly,Asx, Thr,Pro-
T (S)		Ala-----Ala-Gly-Thr-Glu-Cys-Leu-Ile-Ser-Gly-Trp-Gly-Asn-----Thr-Lys-
T (R)		Ser-----Ala-Gly-Thr-Gln-Cys-Leu-Ile-Ser-Gly-Trp-Gly-Asn-----Thr-Lys-
T (H)		Tyr-----Ala-Gly-Glu-Met-Cys-Leu-Ile-Ser-Gly-Trp-Gly-Asn-----Thr-Met-
CA (R)		Phe-Ala-----Ala-Gly-Thr-Thr-Cys-Val-Thr-Thr-Gly-Trp-Gly-Leu-----Thr-Arg-
CB (R)		Phe-Pro-----Ala-Gly-Met-Leu-Cys-Ala-Thr-Thr-Gly-Trp-Gly-Lys-----Thr-Lys-
E (S)		Leu-Ala-----Asn-Asn-Ser-Pro-Cys-Tyr-Ile-Thr-Gly-Trp-Gly-Leu-----Thr-Arg-
Th (R)		Leu-Leu-His-Ala-Gly-Phe-Lys-Gly-Arg-Val-Thr-Gly-Trp-Gly-Asn-Arg-Thr-Thr-

K (S)	146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163
T (S)	Ser, Phe, Gly, Glx, Glx, Phe, Pro, Asx, Ile, Leu, Glx, Cys, Leu, Phe, Ala, Pro, Val, Glx,
T (R)	Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Tyr-Pro-Ser-Leu-Leu-Gln-Cys-Leu-Lys-Ala-Pro-Val-Leu-
T (H)	Ser-Ser-Gly-Thr-Ser-Tyr-Pro-Asp-Val-Leu-Lys-Cys-Leu-Lys-Ala-Pro-Ile-Leu-
CA (R)	Asp-Gly-Ala-Val-Ser-----Gly-Asp-Gln-Leu-Gln-Cys-Leu-Asp-Ala-Pro-Val-Leu-
CB (R)	Tyr-Thr-Asn-Ala-Asn-Thr-Pro-Asp-Arg-Leu-Leu-Gln-Gln-Ala-Ser-Leu-Pro-Leu-Leu-
E (S)	Tyr-Asn-Ala-Leu-Lys-Thr-Pro-Asp-Lys-Leu-Gln-Gln-Ala-Thr-Leu-Pro-Ile-Val-
Th (R)	----Thr-Asn-Gly-Gln-Leu-Ala-Gln-Thr-Leu-Gln-Gln-Ala-Tyr-Leu-Pro-Thr-Val-
	Ser-Val-Ala-Glu-Val-Gln-Pro-Ser-Val-Leu, Gln-Val-Val-Asn-Leu-Pro-Leu, Val-
K (S)	164 165 166 167 A B 168 169 170 A B 171 172 173 174 175 176 177
T (S)	Ser, Asx, Glx, Asx, Glx, Glx, Cys(, Asx, Asx, , Ala, His, Pro, Ala) Lys-Val-Thr-
T (R)	Ser-Asp-Ser-Ser Cys-Lys-Ser-----Ala-Tyr-Pro-Gly-Gln-Ile-Thr-
T (H)	Ser-Asn-Ser-Ser Cys-Lys-Ser-----Ala-Tyr-Pro-Gly-Gln-Ile-Thr-
CA (R)	Ser-Asp-Ala-Glu Cys-Lys-Gly-----Ala-Tyr-Pro-Gly-Met-Ile-Thr-
CB (R)	Ser-Asn-Thr-Asn Cys-Lys-Lys-----Tyr-Trp-Gly-Thr-Lys-Ile-Lys-
E (S)	Ser-Asn-Thr-Asp Cys-Arg-Lys-----Tyr-Trp-Gly-Ser-Arg-Val-Thr-
Th (R)	Asp-Tyr-Ala-Ile Cys-Ser-Ser-Ser-Tyr-Trp-Gly-Ser-Thr-Val-Lys-
	Glu-Arg-Pro-Val Cys-Lys, Ala-Ser-Thr-Arg, ----Arg-Ile-Arg-Ile-Thr-

K (S)	178 179 180 181 182 183 184	A	B	C	185 186 187 188	A	B	189 190
T (S)	Glu-Ser-Met-Leu-Cys-Ala-Gly-Tyr	-----	Leu-Pro-Gly-Gly-Lys	-----	Asp-Thr-			
T (R)	Gly-Asn-Met-Ile-Cys-Val-Gly-Phe	-----	Leu-Glu-Gly-Gly-Lys	-----	Asp-Ser-			
T (H)	Ser-Asn-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr	-----	Leu-Glu-Gly-Gly-Lys	-----	Asp-Ser-			
CA (R)	Asn-Asn-Met-Met-Cys-Val-Gly-Tyr	-----	Met-Glu-Gly-Gly-Lys	-----	Asp-Ser-			
CB (R)	Asp-Ala-Met-Ile-Cys-Ala-Gly	-----	Ala-Ser-Gly-Val	-----	Ser-Ser-			
E (S)	Asp-Val-Met-Ile-Cys-Ala-Gly	-----	Ala-Ser-Gly-Val	-----	Ser-Ser-			
Th (R)	Asn-Ser-Met-Val-Cys-Ala-Gly	-----	Gly-Asn-Gly-Val-Arg	-----	Ser-Gly-			
	Asx-Asx-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Gly-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-							
K (S)	191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204	A	B	205 206				
T (S)	Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Ile-Cys-Asn-Gly-Met	-----						
T (R)	Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Val-Val-Cys-Asn-Gly-Gln	-----						
T (H)	Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Val-Val-Cys-Ser-Gly-Lys	-----						
CA (R)	Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Val-Val-Cys-Asn-Gly-Met	-----						
CB (R)	Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Lys-Lys-Asn	-----						
E (S)	Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Gln-Lys-Asn	-----						
Th (R)	Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-His-Cys-Leu-Val-Asn	-----						
	Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Tyr-Asn-Arg-							

K (S)	241 242 243 244 245 A B
T (S)	Thr-Ile-Thr-Glu-Asn-Pro
T (R)	Thr-Ile-Ala-Ala-Asn
T (H)	Thr-Ile-Ala-Ser-Asn
CA (R)	Thr-Ile-Ala-Ser-Val
CB (R)	Thr-Leu-Ala-Ala-Asn
E (S)	Thr-Leu-Ala-Ala-Asn
Th (R)	Val-Ile-Ala-Ser-Asn
	Val-Ile-Asp-Arg-Leu-Gly-Ser

asen. Eine hierauf gegründete Zuordnung der A-Kette des Kallikreins zum N-terminalen Bereich der Vergleichssequenzen, beginnend mit der Zuordnung des N-terminalen Isoleucinrestes zur Pos.16 des Chymotrypsinogens A, wird durch die Identität von 31 weiteren Aminosäuren der A-Kette mit den entsprechenden Positionen des Schweinetrypsins bestätigt.

Die charakteristische N-terminale Sequenz Ile-Val der Pankreas-serinproteasen und des Thrombins (mit Ausnahme der Sequenz Val-Val der Elastase) ist beim Kallikrein zu der Sequenz Ile-Ile verändert. Wie auch das N-terminale Dipeptid der Elastase zeigt, dürfte ein Austausch Val/Ile wegen des sehr ähnlichen Seitenkettenaufbaus beider Aminosäuren kaum zu erheblichen Veränderungen der Enzymstruktur führen. Während Gly18 nur bei Kallikrein, den Trypsinen und der Elastase vorkommt, scheint Glycin in der Pos.19, vermutlich auf Grund seiner fehlenden Seitenkette, von wesentlicherer Bedeutung für die Struktur zu sein, da es in allen acht verglichenen Sequenzen enthalten ist.

Der Cysteinrest des Kallikreins in der Pos.22 tritt sonst nur noch bei den Trypsinen auf; die anderen Enzyme enthalten in dieser Position Alanin. In Anbetracht der geringen Mutabilität der Aminosäure Cystein (92) und der überragenden Wichtigkeit von Disulfidbrücken für die Enzymstruktur dürfte der Identität von Kallikrein und Trypsin in dieser Position gesteigerte Bedeutung zukommen. So beträgt die Wahrscheinlichkeit, daß bei zwei homologen Proteinsequenzen Cystein in der gleichen Position auf Grund einer gemein-

samen Vorläufersequenz vorkommt, in Relation zur Wahrscheinlichkeit eines Einbaus von Cystein in die gleiche Position zweier verwandter Proteine durch reinen Zufall 16,6 zu 1.

Eine weitere Ähnlichkeit des Kallikreins mit Trypsin (und in diesem Fall auch mit der Elastase) zeigt sich in der Pos.25, in der alle drei Enzyme einen Asparaginrest enthalten.

Pro28, eine Aminosäure, die in allen verglichenen Sequenzen vorhanden ist, könnte auf Grund der aufgehobenen freien Drehbarkeit der Peptidkette am α -C-Atom eine bestimmte Rolle bei der spezifischen Faltung des Polypeptids beinhalten. Der invarianten Position Pro28 folgt bis zur Pos.33 eine Teilsequenz, die von nur wenigen, meist konservativen Aminosäureaustauschen gekennzeichnet ist. So enthalten alle verglichenen Enzyme außer der Elastase in der Pos.29 mit Tyrosin oder Tryptophan eine aromatische Seitenkette. Ebenfalls mit Ausnahme der Elastase (Val/Ile Austausch) ist der Valinrest in Pos.31 invariant. In der Pos.32 zeigt allein Kallikrein einen Alaninrest. Alle anderen pankreatischen Serinproteasen enthalten an dieser Stelle Serin. Die Mutationswahrscheinlichkeitsmatrix zeigt, daß der Austausch von Serin in einer Sequenz gegen Alanin in einer zweiten ein verhältnismäßig häufig auftretendes Ereignis ist. Die Wahrscheinlichkeit, daß in einer bestimmten Position zweier verwandter Sequenzen die Aminosäure Serin erhalten bleibt, ist mit 7 % nur etwas mehr als halb so groß wie die Wahrscheinlichkeit eines Ser/Ala Austausches mit 12 %, so daß die Erhaltung des Serinrestes in allen verglichenen Enzymen

außer dem Kallikrein auf eine gewisse funktionelle Bedeutung schließen lassen könnte.

Zwischen der Pos.33, die mit Isoleucin im Kallikrein und Leucin in allen anderen Serinproteasen wenig variabel ist (Austausch-wahrscheinlichkeit Leu/Ile jedoch nur 6 %!) und dem nächsten Verankerungspunkt für die Zuordnung in der vollständigen invari-
anten Sequenz Cys42- Gly43 ist die Anzahl der Aminosäuren der einzelnen Enzyme verschieden. So enthält Kallikrein in diesem Bereich 7 Reste, die Trypsine weisen 6, die Chymotrypsine 8, die Elastase 11 und das Thrombin 9 Reste auf. Den wahrscheinlichsten Anhaltspunkt für eine möglichst homologe Zuordnung der Aminosäuresequenzen in diesem Bereich bildet die Sequenz His40-Phe41 der Trypsine und der Chymotrypsine. Ihr könnte die Sequenz His-Tyr des Kallikreins zugeordnet werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Histidinrest in der einen Sequenz einem Histidinrest in einer anderen homologen Sequenz entspricht, ist mit 20 % außerordentlich hoch; zahlenmäßig genauso hoch ist die Wahrscheinlichkeit eines Austausches von Phenylalanin gegen Tyrosin. Im Gebiet zwischen den Resten 33 und 42 existiert keine andere Zuordnungsmöglichkeit als die für Kallikrein getroffene mit auch nur annähernd gleich hoher Wahrscheinlichkeit. Jedoch macht eine solche Zuordnung des Kallikreins gegenüber den Trypsinen und Chymotrypsinen zunächst eine den Pos.37 bis 39 entsprechende Deletion und anschließend eine Insertion von 4 Resten zwischen die Pos.41 und 42 dieser Enzyme erforderlich. Zwar dürfte die Deletion von drei Resten durch eine

zwei Positionen weiter erfolgende Insertion von vier Resten strukturell teilweise kompensiert werden, jedoch steht der ansich deutlichen Homologie der Zuordnung, wie sie in Schema 3 getroffen wurde, die verhältnismäßig geringe Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Deletionen und Insertionen gegenüber. Bei einer Anordnung entsprechend der Kettenlänge wäre der Histidinrest des Kallikreins in die Pos.37 zu plazieren. In der Pos. 41 würde dann das Phenylalanin des Kallikreins den Phenylalaninresten von Trypsin und Chymotrypsin entsprechen und nach der Pos.41 müßte für den überzähligen Glutaminrest des Kallikreins die Insertion 41A eingeschoben werden. Welche dieser beiden möglichen Anordnungen eher zutrifft, läßt sich nicht eindeutig festlegen.

Nach der in den pankreatischen Serinproteasen völlig invarianten Sequenz Cys42-Gly43-Gly44 folgt in der Pos.45 ein Austausch von Serin (bzw. in der Elastase Thr) der übrigen verglichenen Enzyme gegen Valin im Kallikrein. In der Pos.46 enthalten alle verglichenen Sequenzen Leucin. Der Rest 47 ist im Kallikrein im Gegensatz zu Isoleucin in den Vergleichssequenzen Valin. Die Wahrscheinlichkeit eines Austausches von Ile gegen Val ist mit 16 % fast doppelt so hoch wie die Wahrscheinlichkeit von 9 %, daß Ile in zwei homologen Sequenzpositionen erhalten bleibt. In der Pos.49 enthält Kallikrein wie Hatripsin einen Prolinrest. Da die Wahrscheinlichkeit, daß in zwei homologen Sequenzen Prolin auf Grund eines gemeinsamen Vorläuferenzym in der gleichen Position auf-

tritt, über viermal so hoch ist wie die Wahrscheinlichkeit eines solchen Zusammentreffens durch reinen Zufall, könnte Pro49 als Relikt eines gemeinsamen Trypsin-Kallikrein Vorläufers angesehen werden, das im Haltrypsin und im Kallikrein erhalten blieb, im Rinder- und Schweinetrypsin jedoch mutiert wurde.

Mit Trp51 bis Cys58 folgt eine Teilsequenz, in der Aminosäureaustausche verhältnismäßig selten vorkommen. Trp51-Val52 ist in allen verglichenen Sequenzen erhalten. Beim Austausch des Valinrestes der Trypsine und Chymotrypsine in der Pos.53 gegen Leucin im Kallikrein handelt es sich um eine verhältnismäßig oft beobachtete Einbasenmutation mit einer Austauschwahrscheinlichkeit von 12 %. Den Aminosäuren Threonin oder Serin in der Pos.54 folgt eine in allen verglichenen Proteinen vollständig invariante Sequenz Ala55-Ala56-His57-Cys58. Diese Sequenz von vier Aminosäureresten beinhaltet neben His57, das für die katalytische Aktivität aller Serinproteasen von Wirbeltieren von wesentlicher Bedeutung ist (s.u.), mit Cys58 auch einen strukturell wichtigen Rest, so daß die vollständige Invarianz dieses Bereiches durch Struktur und Funktion der Serinproteasen bedingt sein dürfte.

Kallikrein weist in der Pos.65 wie die Trypsine und die Chymotrypsine einen Valinrest auf. Die Zuordnung des Glycinrestes von Kallikrein zur Pos.65A des Trypsins und vor allem von Tryptophan in der Kallikreinsequenz zur Pos.66 ist etwas fragwürdig. Sie erfolgte auf Grund der gleichen Kettenlänge von Kallikrein und Trypsin zwischen den Pos.65 und 71. Ein Austausch des Argininrestes

der Trypsine und der Elastase in der Pos.65A gegen Glycin im Kallikrein ist mit 4 % Wahrscheinlichkeit noch ein Vorgang im unteren Wahrscheinlichkeitsbereich, wohingegen ein Austausch Leu/Trp bzw. Val/Trp bislang nie beobachtet wurde.

Den nächsten Verankerungspunkt für die Zuordnung der Sequenz des Kallikreins zu den Sequenzen der anderen Serinproteasen bildet die wenig variierte Sequenz His71-Asn72. In His71 findet sich wiederum eine Position, in der Kallikrein zu den Trypsinen (und in diesem Fall auch zur Elastase und zum Thrombin) deutlichere Ähnlichkeiten als zu den Chymotrypsinen aufweist, die in dieser Position einen Phenylalaninrest enthalten. So beträgt die Wahrscheinlichkeit des Zustandekommens eines Histidinrestes in zwei homologen Sequenzpositionen durch gemeinsame Abstammung das 5,9 fache der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer solchen Konstellation durch zufällige Mutation. Entsprechendes gilt für die Pos.73, in der Kallikrein und die Elastase einen Leucinrest, die Trypsine Isoleucin und die Chymotrypsine Glutamin aufweisen. Die Wahrscheinlichkeitsrelation "gemeinsamer Vorläufer/Zufall" beträgt für die Erhaltung von Leucin in homologen Sequenzpositionen 4,0, für einen Ile/Leu Austausch 1,8 und für einen Leu/Gln Austausch 0,6.

Eine weitere deutliche Ähnlichkeit des Kallikreins mit den Enzymen der Trypsinfamilie zeigt die Pos.77. Glutaminsäure wie in der Kallikreinsequenz tritt in dieser Position nur noch in den Trypsinen und im Thrombin auf. In der Pos.82 enthält Kallikrein, wie-

derum wie die Trypsine (und die Elastase) im Gegensatz zu den Chymotrypsinen (und dem Thrombin) einen aromatischen Rest. Die Wahrscheinlichkeit, daß das Phenylalanin des Kallikreins und der Trypsine aus Rind und Schwein in der Pos.82 auf Grund gemeinsamer Abstammung zustande kam, ist siebenfach größer als die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Zusammentreffens. Die gleiche Wahrscheinlichkeitsrelation beträgt für die Paare Phe/Lys (Kallikrein/Chymotrypsin A, Thrombin) 0,3 und Phe/Val (Kallikrein/Chymotrypsin B) 0,7. Eine ebenso hohe Wahrscheinlichkeit für die Bildung eines Phe/Phe Paares in der gleichen Position auf Grund gemeinsamer Abstammung findet sich in der Pos.89, diesmal jedoch zwischen Kallikrein und den Chymotrypsinen. Fast ebenso hoch ist in dieser Position mit 6,6 die Wahrscheinlichkeitsrelation "gemeinsamer Vorläufer/Zufall" für das Paar Kallikrein/Thrombin (Phe/Tyr). Der Histidinrest in der Pos.91 ist im Kallikrein, den Trypsinen, der Elastase und dem Thrombin, nicht jedoch in den Chymotrypsinen enthalten.

Um den C-Terminus der A-Kette (Ser95B) den anderen Sequenzen des Schemas 3 zuordnen zu können, mußten nach der Pos.95 zwei Reste eingeschoben werden. Jedoch erscheint die Position von Ser95B wegen der unmittelbar benachbarten nur wenig variierten Sequenz Phe94-Asn95 gut gesichert.

■

Ausgeprägte Homologien zwischen der Sequenz der B-Kette des Kallikreins und den Aminosäuresequenzen der Trypsine, der Chymotrypsine

der Elastase und des Thrombins machen die Zuordnung der 152 Aminosäurereste umfassenden B-Kette des Kallikreins zum C-terminalen Bereich dieser Enzyme eindeutig. Der erste N-terminale Fixpunkt zur Festlegung der B-Kettensequenz des Kallikreins in Bezug auf die Vergleichsproteine findet sich in der nur wenig variablen Sequenz Asp102 bis Leu108. Der Rest 102, dem eine wesentliche Funktion bei der katalytischen Aktivität aller Serinproteasen zukommt (s.u.), ist vollständig invariant. In den Pos. 103 und 106 zeigen sich nur Ile/Leu-Austausche. In der Pos.104 gleicht Kallikrein durch seinen Methioninrest den Trypsinen, während die restlichen Serinproteasen Threonin oder Alanin enthalten. Der Austausch von Lys107 der Trypsine, der Chymotrypsine und des Thrombins gegen einen Argininrest im Kallikrein erfordert nur die Mutation eines einzigen Nucleotids und wird wegen seiner konservativen Natur häufig aufgefunden.

Problematisch erscheint die Zuordnung der N-terminalen Sequenz der B-Kette zu den übrigen in Schema 3 aufgeführten Proteinsequenzen. In diesem Bereich weist Kallikrein wie die Elastase gegenüber den Trypsinen und den Chymotrypsinen zwei zusätzliche Reste auf. Der Ort für eine Insertion dieser beiden Aminosäuren ist schwer festzulegen. Auf Grund des Glycinrestes, der im Kallikrein wie im Schweine- und HaiTrypsin in der Pos.96 zu finden ist, könnte ein gemeinsamer Vorläufer dieser Enzyme an einer der Pos.96 homologen Stelle Glycin enthalten haben. HaiTrypsin enthält die Sequenz Gly96-Tyr97-Asp98, die der Kallikreinsequenz

Gly96-Lys-97-Asp98 ähnelt.

Außer der nicht allzu deutlich ausgeprägten Homologie von Kallikrein und Trypsin in den Pos.96 bis 98 beruht die Insertion der zusätzlichen zwei Reste des Kallikreins, wie sie in Schema 3 durchgeführt wurde, auf einer weiteren verhältnismäßig plausiblen Annahme: Nach Reduktion und Alkylierung des Kallikreins konnte im verwendeten Präparat keine Spur einer einkettigen Kallikreininform entdeckt werden. Da Präkallikrein in Analogie zu den Zymogenen der anderen Serinproteasen jedoch ebenfalls als einkettiges Molekül synthetisiert werden dürfte, muß die proteolytische Spaltung in die A- und die B-Kette des aktiven Kallikreins in einem Ausmaß von 100 % erfolgt sein. Als besonders geeignet für einen solch vollständigen proteolytischen Angriff erscheint eine Bindung in einer nach außen gerichteten Schleife der Polypeptidkette. Durch eine Insertion der beiden zusätzlichen Reste im N-terminalen Bereich der B-Kette in unmittelbarem Anschluß an die eingeschobenen zwei C-terminalen Reste der A-Kette zwischen die beiden in einem äußeren loop des Chymotrypsins (39) sitzenden Reste 95 und 96 erhält die Sequenz des Enzyms einen besonderen "Kallikrein-loop" mit mindestens vier zusätzlichen Aminosäureresten, der sterisch günstige Bedingungen für die A/B-Kettenspaltung bedingen könnte.

Die Spaltstelle zwischen der A- und der B-Kette des Kallikreins liegt diesem Schema zufolge zwischen Ser95B und Ala95Y. Die Bezeichnung 95Y und 95Z für die beiden N-terminalen Aminosäuren

der B-Kette wurde gewählt, um anzudeuten, daß in der Sequenz des Präkallikreins zwischen dem C-terminalen Serinrest der A-Kette und dem N-terminalen Alaninrest der B-Kette sehr wohl noch weitere Aminosäuren enthalten sein können, die im Verlaufe der Pankreasautolyse möglicherweise durch proteolytischen Angriff abgespalten wurden (s.u.).

Von der vollständig invarianten Pos. Leu108 über die gleichfalls in allen verglichenen Sequenzen enthaltene Pos. Pro124 folgt bis zum Ende des bislang sequenzierten N-terminalen Bereichs der B-Kette mit Gln127 ein Sequenzabschnitt, in dem Kallikrein in wechselndem Ausmaß deutliche Ähnlichkeiten mit den anderen Serinproteasen aufweist. So enthält Kallikrein in der Pos.114 einen Isoleucinrest, der in allen verglichenen Enzymen außer den Chymotrypsinen auftritt, die an dieser Stelle Phenylalanin enthalten.

Die folgende Lücke in der Sequenz des Kallikreins von der Pos.128 bis zur Pos.174 ist zwar durch sequenatorgerechte Peptide ausgefüllt, jedoch bleibt deren Aminosäuresequenz noch zu ermitteln. Durch die tryptische Spaltung an Aminoäthylcystein ist jedoch die Position von zwei der drei Cysteinreste innerhalb dieser Lücke bekannt. Diese beiden Reste Cys136 und Cys168 treten in allen Vergleichssequenzen (außer Cys136 im Thrombin) auf. Die Position des dritten Cysteinrestes, den Kallikrein innerhalb dieser Lücke enthält, ist noch nicht geklärt, da bei der tryptischen Spaltung die entsprechende Aminoäthylcysteinylbindung praktisch nicht ange-

griffen wurde. Jedoch liegt der Schluß nahe, daß er Cys157, das nur in der Trypsinfamilie vorkommt, zuzuordnen ist (s.u.).

Im Bereich zwischen Gln127 und Cys136 enthält Kallikrein die gleiche Anzahl von Aminosäureresten wie die Trypsine. Die Chymotrypsine und die Elastase weisen jeweils einen zusätzlichen Rest auf. Das Kallikreinpeptid zwischen Cys136 und Cys168 enthält zwei Aminosäurereste mehr als die Trypsine von Rind und Schwein oder die Chymotrypsine. Hältrypsin und Elastase sind jeweils um einen weiteren Rest verkürzt. Das Kallikreinpeptid zwischen Cys 168 und Met180 gleicht in der Länge den Trypsinen und Chymotrypsinen, während die Elastase in diesem Bereich zwei zusätzliche Aminosäuren aufweist.

Außer im Kallikrein tritt ein basischer Rest in der Pos.175 in den Chymotrypsinen und dem Thrombin auf. Nach einem anschließenden nur wenig variablen Sequenzbereich von Met180 bis Gly184, in dem die drei Reste Met180, Cys182 und Gly184 in allen verglichenen Proteinen auftreten, folgt als Rest 184A im Kallikrein, den Enzymen der Trypsinfamilie und dem Thrombin ein aromatischer Tyrosin- oder Phenylalaninrest, der in den Chymotrypsinen und der Elastase fehlt. Anschließend an die invariante Pos. Gly187 enthalten alle in Schema 3 aufgeführten Enzyme mit Ausnahme der beiden Chymotrypsine in der Pos.188A eine basische Aminosäure.

Mit Asp189 liegt auch im Kallikrein ein Aminosäurerest vor, der analog seiner Funktion bei den Trypsinen (s.u.) von ausschlagge-

bender Bedeutung für die Primärspezifität beider Enzyme für positiv geladene Seitenketten sein dürfte. Nach einem konservativen Ser/Thr Austausch (Austauschwahrscheinlichkeit dennoch nur 6 %) in der Pos.190 und der invarianten Position Cys191 enthält Kallikrein in der Pos.192 einen Methioninrest. In dieser Hinsicht gleicht es den Chymotrypsinen, während die anderen Serinproteasen nach Schema 3 in dieser Position Glutamin oder Glutaminsäure enthalten. Die geringe Austauschwahrscheinlichkeit Met/Gln von 1 % unterstreicht die Ähnlichkeit von Kallikrein und Chymotrypsin in dieser Position.

Der in Richtung auf den C-Terminus folgende Sequenzabschnitt Gly 193 bis Pro198 zeigt in allen verglichenen Proteinsequenzen keinen einzigen Aminosäureaustausch. Da diese Teilsequenz den für die katalytische Aktivität der Serinproteasen primär wesentlichen Rest Ser195 umschließt, dürfte diese Invarianz von der unmittelbaren Bedeutung dieser Reste für die Konformation des aktiven Zentrums dieser Enzyme herrühren. Dieser wenig variable Bereich erstreckt sich zumindest beim Kallikrein, den Trypsinen und den Chymotrypsinen noch bis Cys201.

Der Glycinrest in der Pos.203 des Kallikreins und der Trypsine weist wiederum auf die besonders enge Verwandtschaft beider Proteine hin. Die Wahrscheinlichkeit, daß Gly203 in Kallikrein und Trypsin auf Grund eines gemeinsamen Vorläufers statt durch bloßen Zufall zustande kam, beträgt 2,9 zu 1; die gleiche Relation für Gly/Lys (Kallikrein/Chymotrypsin) beläuft sich demgegenüber

nur auf 0,7 zu 1. Ebenfalls als Relikt eines gemeinsamen Vorläufers kann der Methioninrest angesehen werden, der sich im Kallikrein und im Hatripsin in der Pos.204 befindet.

Zwischen Met204 und der nur wenig variablen Sequenz 211 bis 216 erstreckt sich ein Abschnitt, in dem die in Schema 3 verglichenen Enzyme verschiedene Kettenlängen aufweisen. Kallikrein enthält in dieser Teilsequenz ebensoviele Aminosäurereste wie die Trypsine - ein weiterer wesentlicher Hinweis auf die relativ enge Verwandtschaft beider Enzyme - während die Chymotrypsine und die Elastase vier, das Thrombin sechs zusätzliche Reste aufweisen.

Auf Grund der gleichen Kettenlänge von Kallikrein und Trypsin in diesem Bereich wurde der Tryptophanrest des Kallikreins der Pos. 209 zugeordnet, in der sowohl die Trypsine als auch die Chymotrypsine einen Leucinrest enthalten. Zwar wurde die Einbasenmutation Leu/Trp nach (92) bislang nicht beobachtet, jedoch ist das Auftreten eines solchen Aminosäureaustausches dadurch nicht ausgeschlossen. Als weitere Möglichkeit für eine Mutation von Leucin zu Tryptophan wäre an die Aufeinanderfolge von zwei Mutationen in dieser Position zu denken, wie sie etwa ein Austausch Leu/Phe und anschließend Phe/Trp darstellen, die beide eine Austauschwahrscheinlichkeit von 5 % aufweisen.

Mit Gln210 zeigt sich wiederum die Verwandtschaft Kallikrein/Trypsin, während die folgende Sequenz bis Gly216 in allen ver-

glichenen Proteinen nur wenige Veränderungen aufweist. Zu erwähnen ist, daß Kallikrein in diesem Sequenzabschnitt in der Pos.213 einen Threoninrest gegenüber Valin in allen anderen Sequenzen enthält. Die Austauschwahrscheinlichkeit Val/Thr liegt mit 7 % im mittleren Bereich.

Als nächster sicherer Zuordnungspunkt erscheint innerhalb sämtlicher verglichener Sequenzen Cys220. Zwischen Gly216 und Cys 220 enthält Kallikrein mit einem Aminosäurerest mehr als die Trypsine und das Thrombin genausoviele Reste wie die Chymotrypsine und einen Rest weniger als die Elastase. Ebenfalls den Chymotrypsinen gleicht Kallikrein mit Threonin in der Pos.219, in der alle anderen Vergleichssequenzen Glycin aufweisen. Die Position 221A, die im Kallikrein, den Trypsinen, der Elastase und dem Thrombin enthalten ist, fehlt den Chymotrypsinen.

Eine weitere Ähnlichkeit zwischen Kallikrein und Trypsin zeigt sich in der Pos.223, in der beide Enzyme einen Asparaginrest aufweisen. Gleiches gilt für Lys224 in Kallikrein, Trypsin, Elastase und Thrombin. Die gleichen Enzyme enthalten in der Pos.229 Threonin im Gegensatz zu einem Alaninrest in den Chymotrypsinen. Wiederum mit Ausnahme der Chymotrypsine (und in diesem Fall des Thrombins) zeigt die Pos.234 in Kallikrein, Trypsin und Elastase einen Tyrosinrest. Die Wahrscheinlichkeit des gemeinsamen Auftretens eines Tyrosinrestes in zwei homologen Sequenzpositionen auf Grund gemeinsamer Abstammung in Relation zu ihrem homologen

Auftreten auf Grund bloßen Zufalls beträgt 13,7 zu 1.

Neben der invarianten Pos. Trp237 weist Kallikrein im C-terminalen Bereich deutliche, jedoch wechselnd ausgeprägte Ähnlichkeiten mit den Aminosäuresequenzen aller verglichenen Proteine auf. Über den für die Pankreasserinproteasen der Wirbeltiere charakteristischen C-Terminus Asn245 hinaus enthält Kallikrein als zusätzliche Aminosäure Prolin, das den C-terminalen Rest der B-Kette des Kallikreins bildet.

Der zusätzliche C-terminale Prolinrest des Kallikreins könnte, da er für Carboxypeptidasen nur schwer angreifbar ist (98), eine gewisse Rolle beim Schutz des Enzyms gegen proteolytische Verdauung im Intestinaltrakt spielen und damit zu der verhältnismäßig hohen Stabilität des Kallikreins während der Darmpassage (1) beitragen. Eine ähnliche Funktion für die Stabilisierung des Kallikreinmoleküls könnte übrigens auch den beiden Polysaccharidseitenketten des Enzyms zukommen (99), obwohl andererseits auch an eine Mitwirkung der Kohlehydratanteile beim Transport dieses Enzyms durch Membranen zu denken ist (100).

Der hier durchgeführte Vergleich einzelner Aminosäurereste des Kallikreins mit den entsprechenden Sequenzpositionen anderer Serinproteasen zeigt klar die enge strukturelle Verwandtschaft des Kallikreins mit dieser Gruppe von Enzymen. Die Resultate weisen Kallikrein unzweifelhaft neben Trypsin, Chymotrypsin und Elastase als viertes Mitglied der Familie der Serinproteasen

des Pankreas aus. Darüber hinaus wurde aus einer Reihe struktureller Merkmale deutlich, daß die Homologie der Aminosäuresequenz des Kallikreins mit jener des Trypsins ausgeprägter ist als mit den Sequenzen von Chymotrypsin, Elastase und Thrombin. Eine Diskussion dieser Verwandtschaftsverhältnisse folgt im übernächsten Abschnitt.

Aufbau des Kallikreinmoleküls aus Ketten

Die Möglichkeit einer lückenlosen Zuordnung der Aminosäuresequenz des Kallikreins zu den Sequenzen anderer Pankreasserinproteasen liefert einen weiteren Hinweis darauf, daß im Verlaufe der Ermittlung der Primärstruktur des Kallikreinmoleküls keine Sequenzabschnitte übersehen wurden.

Somit ist die bislang umstrittene Frage nach dem Molekulargewicht des Kallikreins aus Schweinepankreas (vgl. Kap.I) endgültig zu beantworten. Während Sache et al. (101) in einer 1974 veröffentlichten Untersuchung der Eigenschaften von Schweinepankreaskallikrein zwei hauptsächliche Formen dieses Enzyms mit Molekulargewichten des Proteinanteils um 33 000 Dalton beschrieben, wurde das Molekulargewicht des Proteinanteils von Kallikrein B in unserem Arbeitskreis durch Titration des aktiven Zentrums zu 24 000 $\pm$ 860 (31) und durch Aminosäureanalyse zu 25 300 Dalton (18) fest-

gelegt. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse bestätigen diesen letzteren Wert. Als Summe der Molekulargewichte der Proteinbestandteile beider Kallikreinketten ergibt sich der vorliegenden Arbeit zufolge ein Wert von 25 600 Dalton. Addiert man dazu (nach Tab.1) einen durchschnittlichen Kohlehydratanteil von 11,5 % in Kallikrein B, so beläuft sich das Molekulargewicht des Gesamtmoleküls auf etwa 28 900.

Zwischen den Untersuchungen von Sache et al. (101) und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit besteht eine weitere Diskrepanz. Diese Autoren fanden in ihrer Kallikreinform d_1 , die dem von uns verwendeten Kallikrein B entsprechen dürfte (18), nach Reduktion mit Mercaptoäthanol bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese in harnstoffhaltigen Gelen drei Banden, denen sie Molekulargewichte von 17 000, 11 000 und 7 000 zuschrieben. Im Verlaufe unserer Arbeiten über die Primärstruktur von Kallikrein B ergaben vergleichbare Elektrophoresen (Abb.4) jedoch nur eine Auftrennung in zwei Banden, die den beiden präparativ isolierten Ketten des Kallikreinmoleküls entsprachen. Die zwei zusätzlich in verhältnismäßig geringem Ausmaß aufgefundenen Bruchstücke der B-Kette trennten sich auf Grund ihrer ähnlichen Größe unter den Bedingungen dieser Elektrophorese nicht von der Bande der A-Kette ab.

Zieht man in Betracht, daß die Untersuchungen von Sache et al. mit Kallikreinpräparaten durchgeführt wurden, die nur knapp die Hälfte der spezifischen Aktivität des von uns verwendeten Mate-

rials aufwiesen (18), so könnten die von unseren Ergebnissen abweichenden Befunde dieser Autoren durch einen wesentlich stärkeren Abbau der verwendeten Enzympräparate im Verlaufe des Isolierungsprozesses erklärt werden.

Während die proteolytische Spaltung des vermutlich einkettig synthetisierten Kallikreinmoleküls in A- und B-Kette im Verlaufe der Pankreasautolyse (zumindest in den untersuchten Präparaten) vollständig verlaufen sein muß, wurde die zweite Spaltstelle des Enzymmoleküls (innerhalb der B-Kette) nur in einem Ausmaß von 10 - 20 % gefunden. Tab.41 enthält einen Vergleich der internen Spaltstellen des Kallikreins mit jenen, die in verschiedenen Formen von Trypsin und Chymotrypsin aufgefunden wurden. Es zeigt sich, daß weder die A/B-Kettenspaltstelle noch die interne Bruchstelle der B-Kette irgendeiner der in den anderen beiden Enzymen aufgetretenen Spaltstellen entspricht.

Nachdem eine Autolyse wie bei Trypsin und Chymotrypsin beim Kallikrein wegen der fehlenden allgemeinen proteolytischen Aktivität nicht sehr wahrscheinlich ist, bleibt die Frage nach der Art des proteolytischen Angriffs zu beantworten, der die beiden Spaltstellen des Kallikreinmoleküls verursachte. Der C-Terminus der um eine Aminosäure längeren Variante der A-Kette ist Serin, also weder ein aromatischer oder großer aliphatischer Rest, die speziell für einen chymotryptischen, noch ein Rest mit einer positiv geladenen Seitenkette, die speziell für einen tryptischen An-

Tab.41 Vergleich der internen Spaltstellen des Kallikrein-moleküls mit den Spaltstellen verschiedener Formen von Trypsinogen und Chymotrypsinogen

Bezeichnung	gespaltene Bindung des Zymogens (zusätzlich zu Lys(Arg)15-Ile16)
η -Chymotrypsin (102)	keine
δ -Chymotrypsin (102)	Leu13-Ser14
α - und γ -Chymotrypsin (102)	Leu13-Ser14 Tyr146-Thr147 Asn148-Ala149
β -Trypsin (103)	keine
α -Trypsin (103)	Lys145-Ser146
(Trypsin) (104)	Lys60-Ser61
(Trypsin) (104)	Arg117-Val118
Pseudotrypsin (105)	Lys188A-Asp189 Lys145-Ser146
Kallikrein:	
A-Kette/B-Kette	Ser95B-X?-Ala95Y
B-Kette intern	X174-Lys175-Val176

griff hätte auslösend wirken können. Ein derartiger Rest könnte jedoch nach der Spaltung zwischen der A- und der B-Kette durch die Einwirkung von Carboxypeptidasen abgespalten worden sein, wie der teilweise Abbau des C-terminalen Serinrestes der A-Kette zeigt. Analog der autokatalytischen Bildung von α -Chymotrypsin aus η -Chymotrypsin könnte aber auch durch proteolytischen Angriff an zwei Peptidbindungen zwischen Ser95B und Ala95Y ein mehr oder

weniger großes Fragment aus der Sequenz des Präkallikreins herausgetrennt worden sein.

Bei der innerhalb der B-Kette nur in verhältnismäßig geringem Ausmaß aufgetretenen Spaltung kommen auf Grund der Aminosäurezusammensetzung des entsprechenden Peptids als Rest 174 nur die Aminosäuren Asx, Ala, His oder Pro in Betracht. Weiter wurde der Rest Lys175 nur in ca. 25 % aller C-terminalen B-Kettenbruchstücke aufgefunden. Daraus ergeben sich zwei Interpretationsmöglichkeiten: Einerseits könnte während der Autolyse des Pankreas die Bindung X174-Lys175 durch einen chymotryptischen Angriff, die Bindung Lys175-Val176 in etwas geringerem Maße durch einen tryptischen Angriff gespalten worden sein. Andererseits wäre nach der proteolytischen Spaltung der Bindung X174-Lys175 an die Abtrennung des freigesetzten aminoterminalen Lysinrestes durch den Angriff einer ebenfalls im Pankreassaft des Schweines enthaltenen Aminopeptidase (106) zu denken.

Im Chymotrypsin (97) findet sich sowohl die Bindung Asn95-Ser96 als auch Thr174-Lys175 an der Oberfläche des Moleküls in weit nach außen weisenden Kettensegmenten. Damit dürften auch im Kallikrein beide Peptidbindungen einem enzymatischen Angriff leicht zugänglich sein.

Verwandtschaftsbeziehungen

Wie bereits bei der Zuordnung der Kallikreinsequenz zu den Aminosäuresequenzen anderer Serinproteasen deutlich wurde, weist das allgemeine Muster der Ähnlichkeiten unter den in Schema 3 aufgeführten Enzymen eine Reihe von Bereichen mit ausgeprägter Homologie zwischen allen verglichenen Sequenzen auf, die von Regionen mit geringerem Homologiegrad unterbrochen sind. 32 der insgesamt 186 verglichenen Aminosäurepositionen (17 %) sind in allen Enzymen des Schemas 3 identisch. Tab.42 faßt das relative Ausmaß der Identität und Ähnlichkeiten zwischen der bisher aufgeklärten Aminosäuresequenz des Kallikreins und den Sequenzen der Vergleichsproteine nach Schema 3 zusammen. Erwartungsgemäß wurden demnach Aminosäuren an der Moleküloberfläche wesentlich häufiger ausgetauscht als solche im Inneren des Enzyms. Die Tab.42 zeigt, daß die Homologie des Kallikreins zum Trypsin deutlich ausgeprägter ist als zu den anderen Enzymen. Daß es sich dabei nicht um eine spezifisch innerhalb des Pankreas der Spezies Schwein vorhandene Ähnlichkeit von Trypsin und Kallikrein handelt, geht aus den Daten für Rinder- und HaiTrypsin hervor. Das Kallikrein des Schweines zeigt sogar zum Trypsin des Haies, dessen Entwicklungslinie sich vor etwa 400 Millionen Jahren von der Linie abgetrennt hat, die zu den Säugetieren führte (51), eine nähere Verwandtschaft als zur Elastase aus dem Pankreas der gleichen Spezies oder zum

Tab.42 Homologiebeziehungen zwischen der Aminosäuresequenz des Kallikreins und den Sequenzen der anderen in Schema 3 aufgeführten Serinproteasen

Enzyme	alle Reste		innere Reste		äußere Reste	
	ident.ähnl.		ident. ähnl.		ident. ähnl.	
	%	%	%	%	%	%
Trypsin (Schwein)	45	55	62	79	34	41
Trypsin (Rind)	43	53	62	77	31	38
Trypsin (Hai)	41	53	63	77	28	37
Chymotrypsin A (Rind)	34	47	61	75	18	30
Chymotrypsin B (Rind)	35	47	62	75	18	30
Elastase (Schwein)	37	49	55	72	26	35
Thrombin (Rind)	33	45	59	69	17	30

Die Ähnlichkeiten sind definiert als (36): Lys=Arg, Asp=Glu, Asp=Asn, Glu=Gln, Ser=Thr, Val=Ile, Ile=Leu, Tyr=Phe=Trp;

Chymotrypsin des Rindes. Innerhalb der Familie der Trypsine ist der Verwandtschaftsgrad jedoch viel höher als zwischen Kallikrein und den Trypsinen. Während Kallikrein und Trypsin aus dem Pankreas der gleichen Spezies 45 % identische Reste aufweisen, zeigt das Trypsin aus dem Katzenhai mit dem Trypsin des Rindes in 65 % aller Positionen identische Aminosäurereste (51). Kallikrein ähnelt somit zwar der Enzymfamilie der Trypsine etwas mehr als

jenen der Chymotrypsine und Elastasen, jedoch ist die Ähnlichkeit der Trypsine untereinander sehr viel stärker. Der Homologiegrad zwischen Kallikrein und den Chymotrypsinen, der Elastase sowie der B-Kette des Thrombins andererseits ist vergleichbar groß.

Obwohl die Aufklärung der Disulfidbrückenstruktur des Kallikreins noch aussteht, erlaubt doch die Auffindung von 9 der 10 Cysteine des Kallikreins in Positionen homolog zu anderen Serinproteasen Vermutungen darüber mit einem hohen Grad an Wahrscheinlichkeit. Den Trypsinen, der Elastase, den Chymotrypsinen und dem Thrombin sind drei Disulfidbrücken gemeinsam, die alle bereits in ihrem gemeinsamen Vorläuferenzym enthalten gewesen sein dürften (107): Cys42-Cys58 ("Histidinloop"), Cys168-Cys182 ("Methioninloop") und Cys191-Cys220 ("Serinloop"). Kallikrein enthält in allen sechs entsprechenden Positionen ebenfalls jeweils einen Cysteinrest, so daß sehr wahrscheinlich ist, daß die gleichen drei Disulfidbrücken auch im Kallikreinmolekül vorhanden sind. Analog dazu dürfte die "B-C-Ketten-Brücke" (Cys136-Cys201) im Kallikrein ebenso vorliegen wie in den anderen Serinproteasen mit Ausnahme des Thrombins (36).

Die fünfte Disulfidbrücke des Kallikreins dürfte der "N-terminalen Brücke" (Cys22-Cys157) entsprechen, die sonst nur noch im Trypsin zu finden ist (36). Die sechste Disulfidbrücke des Trypsins, die "C-terminale Brücke", fehlt auch im Kallikrein.

Erwerb und Verlust von Disulfidbrücken sind im Verlaufe der Evolution äußerst seltene Vorkommnisse, da sie spezifische Ereignisse gleichzeitig an zwei verschiedenen Positionen erfordern, um das Auftreten freier Sulfhydrylgruppen und damit Störungen der richtigen Faltung der Polypeptidkette zu vermeiden. Es ist daher unwahrscheinlich, daß in zwei verschiedenen Enzymen eine Disulfidbrücke durch voneinander unabhängige Prozesse in vergleichbaren Positionen entstanden ist. Das Auftreten einer gemeinsamen Disulfidbrücke des Kallikreins und des Trypsins, die in keiner weiteren Serinprotease des Pankreas vorkommt, ist somit neben dem beiden Enzymen gemeinsamen Rest Asp 189, der die Spezifität für basische Aminosäuren bewirkt, und einer Anzahl weiterer bereits erläuterten struktureller Ähnlichkeiten ein zusätzlicher Hinweis auf die engere Verwandtschaft beider Enzyme gegenüber anderen Pankreasserinproteasen.

Nach Neurath et al. (107) läßt die enge strukturelle Beziehung der Pankreasenzyme Trypsin, Chymotrypsin A und B sowie Elastase und des Leberenzym Thrombin auf die gemeinsame Herkunft aus einem Vorläuferenzym mit trypsinähnlicher Spezifität schließen. Im Verlaufe der zu den heutigen Serinproteasen der Wirbeltiere führenden Entwicklung muß sich zunächst die Linie des Thrombins vom gemeinsamen Stamm der Pankreasenzyme abgetrennt haben (107). Nach dieser Aufspaltung in die Gruppe der Blutgerinnungs- und der Verdauungsenzyme erfolgte wesentlich später eine weitere Gen-

duplikation des Vorläufers der pankreatischen Serinproteasen. Für eine verhältnismäßig kurze Periode muß dieses duplizierte Gen einem drastischen Wechsel unterworfen gewesen sein, währenddessen sich die Vorläufer der Chymotrypsine und der Elastase vom Trypsin abspalteten (107). Die Reihenfolge der Aufspaltung dieses Vorläuferenzym in die Linien, die zu den heute existierenden Trypsinen, Chymotrypsinen und Elastasen der Wirbeltiere führte, konnte bislang nicht eindeutig festgelegt werden (107).

Die enge strukturelle Beziehung des Kallikreins zu den Serinproteasen des Pankreas legt eine Herkunft auch dieses Enzyms aus dem gemeinsamen Vorläufer der Verdauungsenzyme dieses Organs nahe. Darüber hinaus weist die besondere Ähnlichkeit des Kallikreins mit dem Trypsin darauf hin, daß die Entwicklungslinie des Kallikreins sich erst nach den Entwicklungslinien der Chymotrypsine und der Elastase von der Trypsinlinie abgetrennt hat.

3. Über die Beziehungen zwischen Struktur und Reaktivität

Die bisher bekannten dreidimensionalen Strukturen von Trypsin (38), Chymotrypsin (39) und der Elastase (40) demonstrieren deutlich, daß die Tertiärstruktur einer Gruppe homologer Enzyme im Verlauf der divergierenden Entwicklung getreuer konserviert wird als die

Primärstruktur. Obwohl die Identität einzelner Aminosäurepositionen zwischen der aus *Streptomyces griseus* isolierten Serinprotease B und den entsprechenden Positionen der pankreatischen Serinproteasen unter 20 % liegt, zeigt auch die mittlerweile aufgeklärte Tertiärstruktur des mikrobiellen Enzyms (108) vor allem in Bereichen mit funktioneller Bedeutung große Ähnlichkeit mit den Raumstrukturen der Enzyme der Trypsinfamilie. Somit dürfte für die folgende Diskussion die Annahme gerechtfertigt sein, daß die räumliche Struktur des Kallikreins den dreidimensionalen Strukturen von Trypsin bzw. Chymotrypsin weitgehend entspricht.

Aktivierung

Der Vergleich der Raumstrukturen des Chymotrypsinogens A und des Chymotrypsins A (109,110) hat gezeigt, daß der tryptischen Spaltung der Bindung Arg15-Ile16 bei der Aktivierung des Enzyms eine 180°-Drehung der Peptidkette in diesem Bereich folgt. Dabei werden die bislang nach außen gerichteten Seitenketten von Ile16 und Val17 ins Innere des Moleküls gedreht. Die α -Aminogruppe von Ile16 nähert sich durch diese Drehung der im Inneren des Moleküls liegenden γ -Carboxylgruppe von Asp194, mit der sie ein Ionenpaar bildet. Die Bildung dieses Ionenpaares ist von wesentlicher

Bedeutung für die Aufrechterhaltung der aktiven Konformation des Enzyms (111). Bei der Blockierung der γ -Carboxylgruppe von Asp194 mit Glycinmethylester verliert das Molekül seine enzymatische Aktivität (112). Da Kallikrein außer einem Isoleucinrest in der N-terminalen Position wie alle Vergleichsenzyme in der Pos.194 einen Asparaginsäurerest enthält, dürfte diese Ionenpaarbildung auch für die aktive Konformation des Kallikreins von Bedeutung sein.

In der Pos.192 enthält Kallikrein wie die Chymotrypsine im Gegensatz zum Trypsin, der Elastase und dem Thrombin einen Methioninrest. Die Position dieses Methioninrestes verändert sich im Verlauf der Aktivierung des Chymotrypsins ungewöhnlich stark (113). Von einer Position tief im Inneren des Chymotrypsinogenmoleküls wird die hydrophobe Seitenkette von Met192 bei den Konformationsänderungen, die die Aktivierung des Enzyms begleiten (113), an die Oberfläche des Moleküls gebracht, wo sie den Rand der Spezifitätstasche mitbegrenzt.

Über den Mechanismus der Freisetzung von Kallikrein aus seiner Zymogenform, die sich im Molekulargewicht nicht nennenswert vom aktiven Enzym unterscheidet (17), ist bislang nur bekannt, daß sie (neben einer nicht genau definierbaren "Spontanaktivierung") durch die Einwirkung von Trypsin auszulösen ist (1). Weiterhin ist die Sequenz der vier N-terminalen Reste des Kallikreins (Ile 16 bis Gly19) praktisch identisch mit den entsprechenden Positionen der anderen Serinproteasen, so daß für Kallikrein wohl ein

analoger Aktivierungsmechanismus angenommen werden darf, wie er am Beispiel des Chymotrypsins beschrieben wurde. Demzufolge sollte sich in der Pos.15 des Präkallikreins ebenfalls ein, dem tryptischen Angriff zugänglicher Lysin- oder Arginirest befinden.

Aktives Zentrum

Eine Reihe von Untersuchungen an Chymotrypsin zeigten die wesentliche Bedeutung der beiden Reste Ser195 (114) und His57 (115,116) für die katalytische Aktivität des Enzyms. Ein prinzipiell ähnlicher Wirkungsmechanismus wie für Chymotrypsin konnte auch für Kallikrein wahrscheinlich gemacht werden (19,25-27).

Wie man aus der Röntgenstrukturanalyse von Trypsin (38) und Chymotrypsin (39) weiß, hat die primäre Substratbindungsstelle dieser Enzyme die Form einer tiefen Tasche, in der die Reste His 57 und Ser195 liegen, die zusammen mit Asp102 das chemisch aktive Zentrum des Enzyms ausmachen. Zwei Seiten dieser Tasche werden vor allem durch die Sequenzbereiche 189-194 und 214-220 gebildet. Sie werden durch die Disulfidbrücke 191-220 verknüpft (117). Ein analoger Bau ist für Kallikrein anzunehmen. In Chymotrypsinkristallen wurde das Pseudosubstrat Formyltryptophan in dieser Tasche gebunden, wobei eine Anzahl nicht polarer Wech-

selwirkungen zwischen Substratanalogem und Enzym festgestellt wurde (113). Das Amidgruppen -NH- des Pseudosubstrates bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Carbonylsauerstoffatom des Restes Ser214 aus (118), der in sämtlichen bisher untersuchten Serinproteasen (vgl. Schema 3) vorhanden ist. Das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe des Substrates befindet sich ebenfalls über einer Wasserstoffbrücke in Verbindung mit den Amid-NH-Gruppen von Gly193 und Ser195, die auch im Kallikrein vorkommen (118). Für die Lösung einer Peptidbindung des Substrates wurde ein katalytischer Mechanismus vorgeschlagen, der ein "Ladungsübertragungssystem" (charge relay system) zwischen den Seitenketten Ser195, His57 und Asp102 beinhaltet (97,119-121). Dadurch wird die Nucleophilizität von O_γ des Ser 195 stark erhöht (97) und somit der entsprechende Angriff am Carbonyl-C-Atom der zu spaltenden Peptidbindung begünstigt. Im Verlauf der Reaktion vermittelt das mesomere System des Imidazolringes von His57 einen Ladungsausgleich zwischen dem tetraedrischen Zwischenprodukt an O_γ von Ser195 und der γ -Carboxylgruppe von Asp102 und verringert somit die Aktivierungsenergie der Spaltung der Peptidbindung.

Primärspezifität

Kallikrein enthält die Aminosäuren der katalytischen Trias Ser195, His57 und Asp102 in zu den anderen Serinproteasen identischen Positionen (Schema 3). Somit dürfte bei der Hydrolyse von Peptidbindungen durch Kallikrein primär derselbe katalytische Mechanismus wirksam werden, wie er am Beispiel des Chymotrypsins charakterisiert wurde.

Die hohe Spezifität des Trypsins für positiv geladene Seitenketten als Substrate kann der γ -Carboxylgruppe von Asp189 zugeschrieben werden, die sich an der Seitenwand der Spezifitätstasche befindet (113). Bei der Bindung von Benzamidin in Trypsinkristallen wurde der erwartete Typ von polaren Wechselwirkungen aufgefunden (122). Wie Trypsin enthält auch Kallikrein (und Thrombin) in der Position 189 einen Asparaginsäurerest, so daß die Primärspezifität des Kallikreins für die Hydrolyse insbesondere von Arginylbindungen die gleiche Erklärung finden dürfte.

Sekundärspezifität

Wie in Kap.I dargelegt, weist Kallikrein im Gegensatz zu Trypsin keine allgemeine proteolytische Aktivität auf. Es erscheint vielmehr als ein Enzym, das speziell der Hydrolyse seines natürlichen

Substrates Kininogen angepaßt ist. Das aktive Zentrum des Kallikreins dürfte in der Lage sein, mit mindestens fünf aufeinanderfolgenden Aminosäureresten seines Substrates in Wechselwirkung zu treten (23).

Kristallographische Untersuchungen der intermolekularen Kontakte zwischen γ -Chymotrypsin und einer Reihe von Derivaten des Phenylalanin-Chlormethylketons (123) zeigten, daß ein Alaninrest in der Position P_3 (Bezeichnung nach (124)) so orientiert ist, daß sowohl seine -NH- als auch seine -CO- Gruppierung mit den -CO- und -NH- Gruppen von Gly216 Wasserstoffbrückenbindungen eingehen kann. Die Reste P_3 bis P_1 des Substrates laufen zu den Aminosäureresten 214 bis 216 derart antiparallel, daß nach Art einer Faltblattstruktur drei Wasserstoffbrückenbindungen entstehen. Weiterhin konnte bei diesen Untersuchungen festgestellt werden, daß energetisch günstige Wechselwirkungen der umfangreichen Seitenkette eines Leucinrestes in P_2 mit den Resten 97 bis 99 des Enzyms auftraten.

Da die Reste 214 bis 216 im Kallikrein ebenso wie in Trypsin, den Chymotrypsinen und im Thrombin die gleiche Sequenz Ser-Trp-Gly aufweisen, läßt sich hieraus kein Hinweis auf den Grund der hohen Spezifität des Kallikreins schon gegenüber kleinen Peptidsubstraten (vgl. Kap.I) ableiten.

Von Bedeutung erscheint dagegen der oben erwähnte Befund, daß eine voluminöse Seitenkette in der Position P_2 des Substrates mit den Resten 97 bis 99 des Enzyms in Wechselwirkung treten

kann. Die Sequenz der Reste 97 bis 99 lautet in den Chymotrypsinen Leu-Thr-Ile(Val) und im Schweine- und Rindertrypsin Asn-Thr-Leu. Im Kallikrein wurde für die Positionen 97 bis 99 die Sequenz Lys-Asp-Tyr ermittelt, die sich deutlich von den anderen Sequenzen in diesem Bereich unterscheidet. Möglicherweise liegt hier der Schlüssel zum Verständnis der starken Bevorzugung eines Phenylalanin-Restes in P_2 eines Peptid- oder Peptidestersubstrates gegenüber Glycin, die bei Trypsin nicht ausgeprägt zu sein scheint.

Wechselwirkung mit Inhibitoren

Die Serinproteasen zeigen sehr starke und spezifische Wechselwirkungen mit hochmolekularen Inhibitoren von Proteinnatur. Während der Trypsininhibitor aus Sojabohnen auf Kallikrein keine aktivitätsmindernde Wirkung ausübt (1), hemmt der aus Rinderpankreas isolierte Inhibitor (Trasylol, PTI) Kallikrein, Trypsin und Chymotrypsin, wenn auch in verschiedenem Ausmaß. So hat die Dissoziationskonstante des Trypsin-PTI Komplexes bei pH 8 den ungewöhnlich geringen Wert von $6,0 \times 10^{-14}$ (125); diejenigen der Komplexe Chymotrypsin-PTI und Kallikrein-PTI liegen mit 9×10^{-9} (126) bzw. 8×10^{-9} (127) wesentlich höher. Die Raumstruktur des Pankreasinhibitors (128) ebenso wie die Raumstruktur des Komplexes aus Schweinetrypsin und PTI (129) sind aufgeklärt. Daraus

ergibt sich, daß Enzym und Inhibitor komplementäre Strukturen aufweisen und als strukturstabile Moleküle assoziieren.

Obwohl nachgewiesen werden konnte, daß bei der Anlagerung von PTI an Trypsin wie im Falle der Hydrolyse eines echten Substrates bei der Bildung eines tetraedrischen Zwischenproduktes eine kovalente Bindung zwischen Lys15 des Inhibitors und Ser195 des Enzyms ausgebildet wird (130), scheint dieser spezielle enzymatische Mechanismus für die Stabilität des Enzym-Inhibitor Komplexes kaum von Bedeutung zu sein. Ein starker Komplex bildet sich nämlich auch zwischen PTI und Anhydrotrypsin, in dem durch die Eliminierung der Hydroxylgruppe von Ser195 die Möglichkeit der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Enzym und Inhibitor nicht mehr gegeben ist (131). Die hohe Stabilität des Enzym-Inhibitor Komplexes muß also aus der Summe der nicht kovalenten Kontakte zwischen beiden Molekülen herrühren.

Ein wesentlicher Beitrag zu dieser Stabilität dürfte von der Salzbrücke geliefert werden, die sich im Trypsin zwischen Lys15 (PTI) und Asp189 ausbilden kann. Bei der Bildung von Pseudotrypsin wird die Peptidbindung zwischen Lys188A und Asp189 gelöst, so daß die Carboxylgruppe von Asp189 der Spezifitätstasche nicht mehr zur Verfügung steht (132). Zwar kann sich zwischen Pseudotrypsin und PTI noch immer ein 1:1 Komplex ausbilden, jedoch sind dessen thermodynamische und kinetische Konstanten drastisch verändert. So ist die Dissoziationskonstante dieses Komplexes um

den Faktor 10^5 größer und die Halbwertszeit beträgt statt 17 Wochen nur noch 18 min (131). Ebenso deutlich zeigt sich die Bedeutung dieser Salzbrücke beim Vergleich der entsprechenden Konstanten der PTI Komplexe von Trypsin und Chymotrypsin. Zwar sind praktisch alle sonstigen Wechselwirkungen zwischen PTI und Trypsin im PTI-Chymotrypsin Komplex aufrechterhalten (131), jedoch führt der Ersatz von Asp189 des Trypsins gegen Ser189 im Chymotrypsin zu ähnlich veränderten Konstanten wie sie beim Pseudotrypsin bestimmt wurden (131). Obwohl Kallikrein wie Trypsin in der Pos.189 einen Asparaginsäurerest aufweist, und somit der Komplex aus Kallikrein und Pankreasinhibitor durch die gleiche Salzbrücke stabilisiert werden könnte wie der Trypsin-PTI Komplex, liegt die Dissoziationskonstante des Kallikrein-PTI Komplexes im gleichen Bereich wie diejenige des Chymotrypsin-PTI Komplexes, dem eine solche Stabilisierungsmöglichkeit fehlt.

Bei der Komplexbildung Trypsin-Inhibitor treten die beiden Bereiche Thr11 bis Ile18 und Val34 bis Arg39 des PTI in Kontakt mit Trypsin. Insgesamt ergeben sich im Komplex Kontaktstellen zwischen je zwei Aminosäuren von Enzym und Inhibitor, die in einer Summe von mehr als 200 Van der Waals-Kontakten, Wasserstoffbrücken und sonstigen Kontakten resultieren. Aus der Summe all dieser Wechselwirkungen ergibt sich die hohe Assoziationsenergie des Komplexes zwischen Trypsin und PTI von 18,5 kcal/mol (125).

In Tab.43 sind nach (129) die Kontaktpunkte zwischen Trypsin und PTI zusammengestellt. Im Vergleich dazu sind die dem Trypsin entsprechenden Aminosäurepositionen des Kallikreins angegeben, die bis auf die Pos.151 alle in den bereits sequenziierten Bereichen des Kallikreinmoleküls liegen.

Tab.43 kann zunächst dazu dienen, eine Vermutung zu diskutieren, die auf Grund der Aminosäuresequenzen einer Reihe von PTI-homologen Inhibitoren geäußert wurde (133,134): Diese Inhibitoren (vgl. Tab.44) unterscheiden sich zwar kaum im Ausmaß der Trypsinhemmung, heben jedoch die Aktivität des Kallikreins in stark unterschiedlichem Maße auf. Da sich diese Inhibitoren durch ihren Arginingehalt in den Pos. P'_2 und P'_{24} unterscheiden, wurde diesen beiden Argininresten eine wesentliche Rolle für die Hemmung des Kallikreins zugeschrieben.

Neben der möglichen Begünstigung einer Komplexbildung durch unspezifische elektrostatische Anziehung zwischen einem besonders basischen Inhibitor und dem anionischen Kallikreinmolekül wäre zunächst an die Bildung von Salzbrücken zwischen Enzym und Inhibitor nach Art der Wechselwirkung $\text{Lys}15^X (=P_1)$ mit $\text{Asp}189$ zu denken. Ein Vergleich der einzelnen Kontaktpositionen zwischen Enzym und Inhibitor nach Tab.43 zeigt, daß tatsächlich in einer Kontaktstelle zwischen P'_{24} ($=\text{Arg}39^X$) von PTI eine neutrale Aminosäure des Trypsins ($\text{Thr}98$) gegen eine Aminosäure mit einer γ -Carboxylgruppe ($\text{Asp}98$) im Kallikrein ausgetauscht ist. Eine Salzbrücke zwischen $\text{Asp}98$ des Kallikreins und einem Arginin-

Tab.44 Sequenzen der Kontaktstellen von polyvalenten Proteaseinhibitoren im Vergleich zu ihrer Fähigkeit, Kallikrein zu hemmen (133)

Inhibitor aus	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P' ₁	P' ₂	P' ₂₃	P' ₂₄	Kalli- krein- hemmung
Rinderorganen	Gly	Pro	Cys	Lys	Ala	Arg	Cys	Arg	++
Seeanemonen	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala	Arg	Cys	Arg	++
Schnecken	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala	Ser	Cys	Arg	+
Rinderkolostrum	Gly	Pro	Cys	Lys	Ala	Ala	Cys	Gln	--

rest in P'₂₄ des Inhibitors könnte also sehr wohl zur höheren Affinität des Kallikreins gegenüber den in P'₂₄ argininhaltigen Inhibitoren führen. Einschränkend muß jedoch festgestellt werden, daß die Begünstigung einer Wechselwirkung zwischen Kallikrein und dem entsprechenden Inhibitor durch eine Salzbrücke Asp98-Arg39^x durch zwei weitere Kontaktstellen von P'₂₄ mit dem Enzym beeinträchtigt werden könnte, in denen jeweils ein neutraler Rest des Trypsins im Kallikrein gegen eine basische Aminosäure ausgetauscht ist (Asn 97/Lys97; Gln175/Lys175). Ob die elektrostatische Abstoßung zwischen diesen basischen Resten des Kallikreins und P'₂₄ des Inhibitors die aus der Bildung einer Salzbrücke Asp98/Arg39^x resultierende Bindungsenergie überzukompensieren vermag, läßt sich derzeit nicht entscheiden.

Der Argininrest in der Position P_2' des Inhibitors dürfte in Kallikrein und Trypsin in ähnlicher Weise zur Stabilität des Komplexes beitragen. Entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Enzymen in den entsprechenden Kontaktstellen wurden bislang nicht aufgefunden (Pos.151 im Kallikrein noch nicht bekannt).

Neben der Bildung einer Salzbrücke könnte auch der Ersatz von Leu99 (Trypsin) gegen Tyr99 (Kallikrein) die Stabilisierung eines Kallikrein/PTI Komplexes bewirken. Wie beim Trypsin am Beispiel der Stabilisierung des Enzym/Inhibitor Komplexes durch Delokalisierung der positiven Ladung der Guanidiniumgruppe von Arg17^x durch Tyr151 in Form eines Charge-Transfer Komplexes diskutiert wurde (129), sollte die positive Ladung der Seitenkette eines Argininrestes in P_{24}' durch einen Charge-Transfer Komplex mit Tyr99 delokalisiert werden können. Unterstützend dabei könnte die mögliche Übernahme einer positiven Teilladung durch die benachbarte γ -Carboxylgruppe von Asp98 wirken.

Obwohl Kallikrein wie Trypsin zur Ausbildung der komplexstabilisierenden Salzbrücke Asp189-Lys15^x befähigt sein dürfte, liegt die Dissoziationskonstante des Kallikrein-PTI Komplexes um den Faktor 10^5 höher als jene des Trypsin-PTI Komplexes. Wie der Vergleich der Dissoziationskonstanten von Trypsin, Pseudotrypsin und Chymotrypsin zeigt (s.o.), befinden sich die Bindungsenergien aus Protein-Protein Wechselwirkungen nach Abzug des Beitrags der Salzbrücke Asp189-Lys15^x beim Trypsin- und beim Chy-

motrypsin-Inhibitorkomplex in der gleichen Größenordnung. Bringt man jedoch im Kallikrein-PTI Komplex für die Stabilisierungsenergie durch die Salzbrücke Asp189-Lys15^x die gleiche Korrektur in Abzug wie beim Trypsin-PTI Komplex, so liegt die verbleibende Dissoziationskonstante, die als Maß für die Energie der sonstigen Protein-Protein Wechselwirkungen betrachtet werden kann, um etwa den Faktor 10⁵ höher als im Trypsin- oder Chymotrypsin-PTI Komplex. Abgesehen von dem Beitrag durch die Salzbrücke Asp189-Lys15^x ist demzufolge die Wechselwirkungsenergie zwischen Kallikrein und dem basischen Pankreasinhibitor wesentlich niedriger als zwischen diesem Inhibitor und Trypsin bzw. Chymotrypsin. Diese geringere Bindungsenergie läßt sich durch einen Vergleich der einzelnen Aminosäureaustausche zwischen Trypsin und Kallikrein in den Kontaktregionen nach Tab.43 zunächst nicht hinreichend erklären.

Ausschlaggebend dafür könnte eine gegenüber dem Trypsin geringfügig veränderte Tertiärstruktur des Kallikreins in den Kontaktbezirken zwischen Enzym und Inhibitor sein. So könnte beim Kallikrein der Einschub der Sequenz Leu95A-Ser95B Ala95Y-Asp95Z allein durch ihren Raumbedarf die Annäherung von Enzym und Inhibitor erschweren. Zieht man jedoch weiterhin in Betracht, daß nach Schema 3 der gegenüber Chymotrypsin erweiterte "Kallikrein-loop" unmittelbar neben einer von Ser96 bis Leu99 reichenden wichtigen Kontaktzone zwischen Trypsin und PTI eingefügt ist, dürfte es ziemlich wahrscheinlich sein, daß dadurch beim Kallikrein auch die Geometrie des Kontaktbereiches selbst gegenüber

jenem von Trypsin oder Chymotrypsin verändert ist. Hinzu kommt im Kallikrein die größere Flexibilität dieses Bereiches durch die Spaltung der Peptidkette zwischen Ser95B und Ala95V. Eine hieraus resultierende wesentlich niedrigere Komplexbildungsenergie zwischen Kallikrein und dem Pankreasinhibitor erscheint vorstellbar.

Ähnliches gilt für einen weiteren Kontaktbereich zwischen Trypsin bzw. Kallikrein und PTI. Wie aus Tab.43 hervorgeht, liegt beim Trypsin eine wesentliche Kontaktregion zwischen Enzym und Inhibitor in der Sequenz Tyr39-His40-Phe41-Cys42. Auch dieser Bereich dürfte im Kallikrein wesentlich veränderte strukturelle Züge aufweisen. Bei der in Schema 3 getroffenen Zuordnung der Kallikreinsequenz zu den Sequenzen der homologen Serinproteasen wurde eine Insertion von vier Aminosäureresten zwischen die Pos. 41 und 42 von Trypsin bzw. Chymotrypsin erforderlich. Selbst wenn diese Insertion strukturell durch eine Deletion von drei Resten unmittelbar vor His40 teilweise kompensiert werden sollte (bzw. wenn die zweite oben erläuterte Zuordnung der Kallikreinsequenz zutreffen sollte), dürfte in diesem Kontaktbereich Enzym-Inhibitor dennoch eine stark veränderte Raumstruktur des Kallikreins gegenüber Trypsin oder Chymotrypsin resultieren, die ebenfalls einen Beitrag zur Herabsetzung der Komplexbildungsenergie leisten könnte.

Noch eine dritte Eigenschaft des Kallikreinmoleküls könnte bedingen, daß die Energie der Komplexbildung zwischen Kallikrein

und PTI wesentlich geringer ist als jene zwischen Trypsin und PTI. In unmittelbarer Nachbarsch zu jener Kontaktregion zwischen Enzym und Inhibitor, die die Pos.96 bis 99 des Enzyms umfaßt, dürfte sich durch Verknüpfung mit Asn95 im Kallikrein eine Polysaccharidseitenkette befinden. Diese könnte allein durch ihre räumliche Ausdehnung eine wesentliche Störung bei der Komplexbildung bewirken.

Während die Summe aller Protein-Protein-Wechselwirkungen im Kallikrein-PTI Komplex noch eine effektive Hemmung der Kallikreinaktivität bewirkt, ist dies zwischen Kallikrein und dem Inhibitor aus Sojabohnen nicht mehr der Fall. Die Kristallstruktur des Komplexes zwischen Schweinetrypsin und Sojabohnen-trypsininhibitor ist ebenfalls aufgeklärt (135). Die beiden Trypsin-Inhibitor Komplexe von PTI und SBI zeigen in ihren Kontaktbereichen ausgeprägte Ähnlichkeiten, so daß die gleichen Faktoren, die als Erklärung der verminderten Komplexbildungsenergie zwischen Kallikrein und PTI herangezogen wurden, auch bei der Unterbindung einer Komplexbildung zwischen Kallikrein und dem Sojabohneninhibitor eine Rolle spielen könnten. Hinzu kommt, daß die Energie der Komplexbildung zwischen Trypsin und SBI mit ca. 15 kcal/Mol (135) deutlich niedriger ist als jene zwischen Trypsin und PTI mit 18,5 kcal/Mol (s.o.). Weiterhin handelt es sich bei SBI um ein ca. dreifach größeres Molekül als bei PTI. Eine stärkere Störung der Komplexbildung zwischen Kallikrein und SBI durch die beiden Polysaccharidseitenketten

des Kallikreins auch in Bereichen außerhalb der eigentlichen Kontaktbezirke zwischen Enzym und Inhibitor erscheint durchaus möglich, so daß es vorstellbar erscheint, daß in der Summe all dieser Störungen einer Assoziation zwischen Kallikrein und SBI der Sojabohneninhibitor gegenüber Kallikrein keine Hemmaktivität aufweist.

Da die Beziehungen zwischen Enzym und Inhibitor denen zwischen Enzym und Substrat stark gleichen, könnten jene drei räumlichen Faktoren, die als mögliche Ursachen für die verhältnismäßig hohe Dissoziationskonstante des Kallikrein-PTI Komplexes im Verhältnis zu jener des Trypsin-PTI Komplexes diskutiert wurden, wesentlich zu der dem Kallikrein eigentümlichen hohen Spezifität der proteolytischen Wirkung beitragen. Eine endgültige Antwort auf die Frage nach den Beziehungen zwischen der Struktur und der charakteristischen Reaktivität des Kallikreinmoleküls muß jedoch wohl bis zur Ermittlung der dreidimensionalen Struktur des Enzyms durch eine Röntgenstrukturanalyse zurückgestellt werden. Für eine solche Bestimmung der Raumstruktur wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Aufklärung der Aminosäuresequenz des Kallikreins eine wesentliche Grundlage gelegt.

VIII. Zusammenfassung

Reduktion und Alkylierung der fünf Disulfidbrücken von Kallikrein B aus Schweinepankreas führten zur Isolierung von zwei Polypeptidketten mit 80 bzw. 152 Aminosäureresten. Die Zuckerreste des Kallikreins verteilen sich auf beide Ketten. Die tryptische Hydrolyse der kleineren A-Kette sowie die Bromcyanspaltung der B-Kette und die anschließende tryptische Spaltung der größeren Fragmente lieferten Peptide, die für den automatischen Edmanabbau geeignet waren.

Schwierigkeiten bei der Reinigung einiger dieser Peptide, die von ihrer Tendenz zur Unlöslichkeit bzw. Aggregation herrührten, wurden durch Chromatographie an SP-Sephadex mit einem Ionenstärkegradienten (NaCl oder Triäthylamin) in schwach gepufferter 50 %iger Essigsäure überwunden. Dieses Chromatographiesystem könnte in vergleichbaren Fällen von generellem Nutzen sein.

Die Ergebnisse von Aminosäureanalyse und automatischem Edmanabbau ermöglichten die Einordnung aller erhaltenen Peptide in die Sequenz ohne zusätzliche Informationen. Das ausgearbeitete Abbauschema bietet ferner die Möglichkeit, etwa nach chemischer Modifikation einzelner Aminosäuren bestimmte Sequenzabschnitte gezielt zu isolieren. Dies dürfte für zukünftige Untersuchungen über Spezifität und Katalysemechanismus des Kallikreins von Be-

deutung sein.

Die vollständige Sequenz der A-Kette konnte durch Sequenatoranalyse der N-terminalen Teilsequenz sowie von drei weiteren Peptiden ermittelt werden. In der B-Kette wurde bisher die Sequenz von 106 Resten festgelegt. Dazu war der automatische Edmanabbau des N-terminalen Bereiches und fünf weiterer Peptide erforderlich. Die Sequenzanalyse von drei weiteren charakterisierten und zugeordneten Peptiden wird die Sequenz der B-Kette vervollständigen.

Die bislang ermittelte Aminosäuresequenz des Kallikreins lautet (Bezifferung analog Chymotrypsinogen A):

16	20	22	25	30
Ile-Ile-Gly-Gly-Arg-Glu-Cys-Glu-Lys-Asn-Ser-His-Pro-Trp-Gln-Val-				
40	42	45		
Ala-Ile-Tyr-His-Tyr-Ser-Ser-Phe-Gln-Cys-Gly-Gly-Val-Leu-Val-Asn-				
50	55	57	58	60
Pro-Lys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Lys-Asn-Asn-Asn-Tyr-Glu-				
65	70	75	80	
Val-Gly-Trp-Leu-Arg-His-Asn-Leu-Phe-Glu-Asn-Glu-Asn-Thr-Ala-Gln-				
85	90	CHC		
Phe-Phe-Gly-Val-Thr-Ala-Asp-Phe-Pro-His-Pro-Gly-Phe-Asn-Leu-Ser/				
100	102	105		
Ala-Asp-Gly-Lys-Asp-Tyr-Ser-His-Asp-Leu-Met-Leu-Leu-Arg-Leu-Gln-				
110	115	120	125	
Ser-Pro-Ala-Lys-Ile-Thr-Asp-Ala-Val-Lys-Val-Leu-Glu-Leu-Pro-Thr-				
130	136	140		
Gln(Pro,Leu,Ser,Glx,Gly,Thr,Glx)Cys(Leu,Ile,Thr,Gly,Trp,Gly,Asx,				

145	150	155	157
Thr,Pro,Ser,Phe,Gly,Glx,Glx,Phe,Pro,Asx,Ile,Leu,Glx,Cys,Leu,			
160	165	168	170
Phe,Ala,Pro,Val,Glx,Ser,Asx,Glx,Asx,Glx,Glx)Cys(Asx,Asx,Ala,			
175	180	182	185
His,Pro,Ala)Lys-Val-Thr-Glu-Ser-Met-Leu-Cys-Ala-Gly-Tyr-Leu-			
189	190	191	194
Pro-Gly-Gly-Lys-Asp-Thr-Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-			
200	201	210	215
Ile-Cys-Asn-Gly-Met-Trp-Gln-Gly-Ile-Thr-Ser-Trp-Gly-His-Pro-			
220	225	230	
Thr-Cys-Gly-Ser-Ala-Asn-Lys-Pro-Ser-Ile-Tyr-Thr-Lys-Leu-Ile-			
235	CHO 240	245	
Phe-Tyr-Leu-Asp-Trp-Ile-Asn-Asn-Thr-Ile-Thr-Glu-Asn-Pro			

Zwischen der Sequenz des Kallikreins und den Sequenzen der anderen Serinproteasen des Pankreas, Trypsin, Chymotrypsin und Elastase, bestehen ausgeprägte Homologien. Die zum "charge relay"-System dieser Enzyme gehörigen Reste His57, Asp102 und Ser195 sind auch im Kallikrein vorhanden, so daß ein gemeinsamer katalytischer Mechanismus angenommen werden kann. Kallikrein bildet somit einen vierten Vertreter der Gruppe der Serinproteasen des Pankreas.

Die Bevorzugung von Substraten mit positiv geladener Seitenkette durch Kallikrein dürfte wie beim Trypsin durch den Rest Asp189 bedingt sein. Obwohl die Verwandtschaft von Kallikrein und Trypsin wesentlich weniger eng ist als diejenige zwischen den Trypsinen verschiedener Spezies, ist doch die Homologie

des Kallikreins zu Trypsin deutlich ausgeprägter als zu Chymotrypsin oder Elastase. Demzufolge dürfte sich Kallikrein entwicklungsgeschichtlich später vom Trypsin getrennt haben als die anderen beiden Serinproteasen des Pankreas.

In den im Kontaktbereich des Trypsins mit dem Inhibitor aus Rinderpankreas gelegenen Positionen 97 bis 99 zeigt Kallikrein eine vollständig andere Sequenz. Zudem sind in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesem Kontaktbereich im Kallikrein vier zusätzliche Aminosäurereste eingeschoben, die die Geometrie dieses Bezirks weiter verändern dürften. Diese Unterschiede könnten für die engere Spezifität des Kallikreins verantwortlich sein. Weitere Aussagen zu diesem Problem dürften mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse des Kallikreins möglich sein, für die mit der Ermittlung der Primärstruktur in der vorliegenden Arbeit eine wesentliche Grundlage gelegt wurde.

Literaturverzeichnis

1. Frey, E.K., Kraut, H. und Werle, E. (1968), Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
2. Werle, E. (1936), Klin. Wschr. 15, 848
3. Werle, E. (1936), Biochem. Z. 287, 235
4. Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T. und Rosenfeld, G. (1949), J. Physiol. (London) 109, 488
5. Boissonnas, R.A., Guttman, St. und Jaquenoud, P.A. (1960), Helv. chim. Acta 43, 1349
6. Pierce, J.V. und Webster, M.E. (1961), Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 353
7. Werle, E., Trautschold, I. und Leysath, G. (1961), Z. physiol. Chem. 326, 174
8. Werle, E. (1937), Biochem. Z. 290, 129
9. Werle, E. (1960), in: Schachter, M. (Ed.), Polypeptides which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels, Pergamon Press, London, S. 199

10. Habermann, E. und Klett, W. (1966), Biochem. Z. 346, 133
11. Sampaio, C., Wang, S.C. und Shaw, E. (1974), Arch. Biochem. Biophys. 165, 133
12. Habermann, E. (1962), Z. physiol. Chem. 328, 15
13. Fritz, H., Eckert, I. und Werle, E. (1967), Z. physiol. Chem. 348, 1120
14. Moriya, H., Kato, A. und Fukushima, H. (1969), Biochem. Pharmacol. 18, 549
15. Kutzbach, C. und Schmidt-Kastner, G. (1972), Z. physiol. Chem. 353, 1099
16. Kutzbach, C. und Schmidt-Kastner, G. (1973), in: Haberland, G.L. und Rohen, J.W. (Eds.), Kininogenases, Schattauer Verlag, Mainz, S. 23
17. Fiedler, F., Hirschauer, C. und Werle, E. (1970), Z. physiol. Chem. 351, 225
18. Fiedler, F., Hirschauer, C. und Werle, E. (1975), Z. physiol. Chem. 356, 1879
19. Fiedler, F. und Werle, E. (1968), Eur. J. Biochem. 36, 152
20. Fiedler, F., Leysath, G. und Werle, E. (1973), Eur. J. Biochem. 36, 152

21. Roberts, D.V. und Elmore, D.T. (1973), Biochem. J. 141, 545
22. Werle, E. und Trautschold, I. (1963), Ann. N. Y. Acad. Sc. 104, 117
23. Werle, E., Fiedler, F. und Fritz, H. (1972), Proc. 5th Int. Congr. Pharmacology, San Francisco, Vol. 5, S. Karger Verlag, Basel, S. 284
24. Habermann, E. (1966), Arch. exper. Path. Pharmacol. 253, 474
25. Habermann, E. (1960), Naturwissenschaften 47, 111
26. Fiedler, F., Müller, B. und Werle, E. (1969), Eur. J. Biochem. 10, 419
27. Fiedler, F., Müller, B. und Werle, E. (1971), Z. physiol. Chem. 352, 1463
28. Moriya, H. (1959), J. Pharmacol. Soc. Japan (Yakugasshi) 79, 1451
29. Fritz, H., Trautschold, I. und Werle, E. (1965), Z. physiol. Chem. 342, 253
30. Andrews, P. (1970), Meth. Biochem. Anal. 18, 1
31. Fiedler, F., Müller, B. und Werle, E. (1972), FEBS Lett. 24, 41

32. Hermodson, M.A., Ericsson, L.H., Neurath, H. und Walsh, K. A. (1973), Biochemistry 12, 3146
33. Davie, E.W. und Neurath, H. (1955), J. Biol. Chem. 212, 515
34. Dayhoff, M.O. (1972), Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol.5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.
35. Hartley, B.S., Brown, J.R., Kauffman, D.L. und Smillie, L.B. (1965), Nature 207, 1157
36. Hartley, B.S. (1970), Phil. Trans. Roy. Soc. London 257, 77
37. Magnusson, S. (1971), in: Boyer, P. (Ed.), The Enzymes, 3. Aufl., Bd.3, Academic Press, New York, S. 277
38. Stroud, R.M., Kay, L.M. und Dickerson, R.E. (1974), J. Mol. Biol. 83, 185
39. Birktoft, J.J., Mathews, B.W. und Blow, D.M. (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 131
40. Shotton, D.M. und Hartley, B.S. (1970), Nature 225, 802
41. Endres, G.F., Swenson, M.K. und Scheraga, H.A. (1975), Arch. Biochem. Biophys. 168, 180
42. Edman, P. und Begg, G. (1967), Eur. J. Biochem. 1, 80

43. Raftery, M.A. und Cole, R.D. (1966), J. Biol. Chem. 241,
3457
44. Butler, P.J.G., Harris, J.I., Hartley, B.S. und Lebermann,
R. (1969), Biochem. J. 112, 679
45. Wang, S.S. und Carpenter, F.H. (1968), J. Biol. Chem. 243,
3702
46. Gross, E. und Witkop, B. (1962), J. Biol. Chem. 237, 1856
47. Stewart, J.W. und Margoliash, E. (1965), Canad. J. Biochem.
43, 1187
48. Moroux, S. und Röver, M. (1966), Biochim. Biophys. Acta
113, 126
49. Hirs, C.H.W. (1967), Meth. Enzymol. 11, 197
50. Mc Kerrow, J.H. und Robinson, A.B. (1971), Anal. Biochem.
42, 565
51. Titani, K., Ericsson, L.H., Neurath, H. und Walsh, K.A.
(1975), Biochemistry 14, 1358
52. Greene, L.J. und Bartelt, D.C. (1968), J. Biol. Chem. 243,
3702
53. Schroeder, W.A., Shelton, J.R. und Robberson, B. (1967),
Biochim. Biophys. Acta 147, 590

54. Neuberger, A., Gottschalk, A., Marshall, R.D. und Spiro, R.G. (1972), in: Gottschalk, A. (Ed.), Glykoproteins, Bd. A, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, S. 450
55. Fowler, A.V. und Zabin, I. (1970), J. Biol. Chem. 245, 5032
56. Röver, M., Bianchetto, J. und Guidoni, A. (1973), Biochim. Biophys. Acta 328, 391
57. Nyman, P.O., Strid, L. und Westermark, G. (1968), Eur. J. Biochem. 6, 172
58. Carpenter, F.H. und Stanley, M.S. (1974), Biochemistry 13, 5159
59. Porath, J. (1955), Nature 175, 478
60. Ambler, R.P. (1965), Biochem. J. 96, 32
61. Armstrong, M.D. (1949), J. Am. Chem. Soc. 71, 3399
62. Smyth, D.G. (1967), Meth. Enzymol. 11, 214
63. White, F.H., Jr. (1967), Meth. Enzymol. 11, 481
64. Cole, R.D. (1967), Meth. Enzymol. 11, 315
65. Crestfield, M.A., Moore, S. und Stein, W.H. (1963), J. Biol. Chem. 238, 622

66. Handbook of Chemistry and Physics (1968), Weast, R.C. (Ed.),
The Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio
67. Butler, P.J.G. und Hartley, B.S. (1972), Meth. Enzymol. 25,
191
68. Moore, S. und Stein, W. (1954), J. Biol. Chem. 211, 907
69. Rudloff, V. und Braunitzer, G. (1961), Z. physiol. Chem. 323,
129
70. Swank, R.T. und Munkres, K.D. (1971), Anal. Biochem. 39, 462
71. Maurer, H.R. (1968), Disk-Elektrophorese, W. de Gruyter,
Berlin
72. Heilmann, J., Barollier, J. und Watzke, E. (1957), Z. physiol.
Chem. 309, 219
73. Gros, C. und Labouesse, B. (1969), Eur. J. Biochem. 7, 463
74. Wood, K.R. und Wang, K.T. (1967), Biochim. Biophys. Acta 133,
369
75. Briel, G. und Neuhoff, V. (1972), Z. physiol. Chem. 353, 540
76. Stark, G.R. (1967), Meth. Enzymol. 11, 125
77. Schroeder, A.W. (1972), Meth. Enzymol. 25, 138
78. Salinkow, J., Ta-Hsiu, L., Moore, S. und Stein, W.H. (1973),
J. Biol. Chem. 248, 1480

79. Liu, T.Y. und Chang, Y.H. (1971), J. Biol. Chem. 246, 2842
80. Spackman, D.H., Stein, W.H. und Moore, S. (1958), Anal. Chem. 30, 1190
81. Hofmann, T. (1964), Biochemistry 3, 356
82. Edelhoeh, H. (1967), Biochemistry 6, 1948
83. Gross, E. (1967), Meth. Enzymol. 11, 238
84. Steers, E., Craven, G.R. und Anfinsen, C.B. (1965), J. Biol. Chem. 210, 2478
85. Schroeder, P.D. und Shaw, E. (1968), J. Biol. Chem. 243, 2943
86. Sanger, F. und Tuppy, H. (1951), Biochem. J. 49, 481
87. Sanger, F. und Thompson, E.O.P. (1953), Biochem. J. 53, 366
88. Edman, P. (1949), Arch. Biochem. Biophys. 22, 475
89. Titani, K., Hermodson, M.A., Ericsson, L.H., Walsh, K.A. und Neurath, H. (1972), Nature (London) New Biol. 238, 35
90. Titani, K., Hermodson, M.A., Ericsson, L.H., Walsh, K.A. und Neurath, H. (1972), Biochemistry 11, 2427
91. Hapner, K.D. und Wilcox, P.E. (1970), Biochemistry 9, 4470

92. Dayhoff, M.O., Eck, R.V. und Park, C.M. (1972), in l.c. (34), S.89
93. Mc Laughlin, P.J. und Dayhoff, M.O. (1972), in l.c. (34) S. 47
94. Barker, W.C. und Dayhoff, M.O. (1972), in l.c. (34), S.101
95. Hunt, L.T., Sochard, M.R. und Dayhoff, M.O. (1972), in l.c. (34), S. 67
96. Dayhoff, M.O. und Barker, W.C. (1972), in l.c. (34), S. 41
97. Blow, D.M., Birktoft, J.J. und Hartley, B.S. (1969), Nature 221, 337
98. Ambler, R.P. (1967), Meth. Enzymol. 11, 155
99. Faillard, H. und Schauer, R. (1972), in l.c. (54), Teil B, S. 1246
100. Eylar, E.H. (1965), J. Theoret. Biol. 10, 89
101. Zuber, M. und Sache, E. (1974), Biochemistry 13, 3098
102. Wright, H.T., Kraut, J. und Wilcox, P.E. (1968), J. Mol. Biol. 37, 363
103. Cole, R.D. und Kinkade, J.M. (1961), J. Biol. Chem. 236, 2443

104. Maroux, S., Ravery, M. und Desnuelle, P. (1962), Biochim. Biophys. Acta 56, 202
105. Papiannou, S. und Liener, I.E. (1968), J. Chromatogr. 32, 746
106. Uriel, J. und Avrameas, S. (1965), Biochemistry 4, 1740
107. De Haen, C., Neurath, H. und Teller, D.C. (1975), J. Mol. Biol. 92, 225
108. Delbaere, L.T.J., Hutcheon, W.L.B., James M.N.G. und Thiessen, W.E. (1975), Nature 257, 758
109. Sigler, P.B., Blow, D.M., Matthews, B.W. und Henderson, R. (1968), J. Mol. Biol. 35, 143
110. Freer, S.T., Kraut, J., Robertus, J.D., Wright, H.T. und Xuong, Ng.H. (1970), Biochemistry 9, 1997
111. Oppenheimer, H.L., Labouesse, B. und Hess, G.P. (1966), J. Biol. Chem. 241, 2720
112. Carraway, K.L., Spoerl, P. und Koshland, D.E., Jr. (1969), J. Mol. Biol. 42, 133
113. Steitz, T.A., Henderson, R. und Blow, D.M. (1969), J. Mol. Biol. 46 337
114. Hartley, B.S. (1964), Nature 201, 1284

115. Weil, S.J. und Buchert, A.R. (1953), Arch. Biochem. Biophys. 46, 266
116. Ong, E.B., Shaw, E. und Schoellmann, G. (1964), J. Am. Chem. Soc. 86, 1271
117. Blow, D.M. in: 2nd International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. und Truscheit, E., Eds., Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974, S. 473
118. Blow, D.M. (1971), in l.c. (37), S. 185
119. Cunningham, L. (1965), Comp. Biochem. 16, 85
120. Bender, M.L. und Kezdy, F.J. (1965), Ann. Rev. Biochem. 34, 49
121. Bruice, T.C. und Benkovic, S.J. (1966), in: Biorganic Mechanisms, Bd.1, W.A. Benjamin, Amsterdam-New York, S. 212
122. Krieger, M., Kay, L.M. und Stroud, R.M. (1974), J. Mol. Biol. 33, 209
123. Segal, D.M., Powers, J.C., Cohen, G.H., Davies, D.R. und Wilcox, D.E. (1971), Biochemistry 10, 3728
124. Schechter, I. und Berger, A. (1967), Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 157

125. Vincent, J.P. und Lazdunski, M. (1972), Biochemistry 11, 2967
126. Vincent, J.P. und Lazdunski, M. (1973), Eur. J. Biochem. 38, 365
127. Fritz, H., Schult, H., Meister, R. und Werle, E. (1969), Z. physiol. Chem. 350, 1531
128. Deisenhofer, J. und Steigemann, W. (1974), in l.c. (117), S. 484
129. Huber, R., Kukla, D., Steigemann, W., Deisenhofer, J. und Hones, A. (1974), in l.c. (117), S. 497
130. Rühmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K. und Huber, R. (1973), J. Mol. Biol. 77, 417
131. Lazdunski, M., Vincent, P.J. und Schweitz, H. (1974), in l.c. (117), S. 420
132. Smith, R.L. und Shaw, E. (1969), J. Biol. Chem. 244, 4704
133. Wunderer, G. (1975), Dissertation Technische Universität München
134. Dietl, T. und Tschesche, H. (1974), in l.c. (117), S. 254
135. Sweet, R.M., Wright, H.T., Janin, J. und Blow, D.M. (1974), Biochemistry 13, 4212

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AE	aminoäthylisiert bzw. Aminoäthyl-
Asx	Asp oder Asn
CM	Carboxymethyl- bzw. carboxymethyliert
Dansyl	1-Dimethylaminonaphtalin-5-sulfo-
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
DFP	Diisopropylfluorophosphat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
E ₂₈₀	Extinktion bei 280 nm
Glx	Glu oder Gln
HAc	Essigsäure
Hse	Homoserin
Hsl	Homoserinlacton
mal	maleyliert
NPGb	p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat
PTI	Pankreas-Trypsininhibitor (Rind) (Trasylol)
QAE	Quartäres Aminoäthyl-
SBI	Sojabohnentrypsininhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Sulfopropyl-
TEA	Triäthylamin

TEAA Triäthylammoniumacetat
TEAF Triäthylammoniumformiat
TEMED Tetramethyläthylendiimin
Tris Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

LEBENS LAUF

Geburt 14.11.1944 in Augsburg - Göggingen

Eltern August Martin Ehret, Rektor a.D.
Margarete Ehret, geb. Gallion

Ehe seit 27. Mai 1970 verheiratet mit Dr. phil.
Gloria Ehret, geb. Stieber, Kunsthistorikerin

Schulen 1950 - 1955 Besuch der Volksschule in Augsburg
1955 - 1964 Besuch des Realgymnasiums Augsburg
mit dem Abschluß der Reifeprüfung

Wehrdienst Nov. 1964 - Okt. 1966 Feldjägertruppe der BW
Dienstgrad: Olt d.R.

Studium WS 66/67 Jura
SS 67 Beginn des Chemiestudiums an der Universität
München
Vordiplom: SS 69, Hauptdiplomprüfung: SS 71
Diplomarbeit am Institut für Klinische Chemie und
Klinische Biochemie der Universität München unter
Anleitung von Prof. Dr. Dr. E. Werle
Titel: Untersuchungen zur Primärstruktur des Kalli-
kreins aus Schweinepankreas
Im Anschluß daran Arbeiten zur vorliegenden Disser-
tation unter Leitung von Prof. Dr. Dr. E. Werle
(gestorben im Mai 1975) und Prof. Dr. H. Fritz
seit 1. 4. 1974 Verwalter einer wiss. Assistenten-
stelle
seit 1.12. 1975 wiss. Angestellter beim SFB 51

